Aus der Veterinär-Medizinischen Klinik der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. P.F. Suter)
Arbeit unter der Leitung von PD Dr. H. Lutz

Bestimmung von T_3 und T_4 bei Schlachtrindern mittels eines ELISA-Verfahrens im Hinblick auf eine missbräuchliche Anwendung von Thyreostatika

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
HEINER RICKENBACHER
Tierarzt
von Oltingen BL

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. P.F. Suter, Referent
Prof. Dr. J. Blum, Korreferent

Zürich 1986
Fritz Buess, Buch- und Offsetdruck, Gelterkinden

Aus der Veterinär-Medizinischen Klinik der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. P.F. Suter)
Arbeit unter der Leitung von PD Dr. H. Lutz

Bestimmung von T_3 und T_4 bei Schlachtrindern mittels eines ELISA-Verfahrens im Hinblick auf eine missbräuchliche Anwendung von Thyreostatika

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
HEINER RICKENBACHER
Tierarzt
von Oltingen BL

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. P.F. Suter, Referent
Prof. Dr. J. Blum, Korreferent

Zürich 1986
Fritz Buess, Buch- und Offsetdruck, Gelterkinden

Meinen Eltern in Dankbarkeit,

meiner Frau in Liebe gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Schilddrüse

2.1.1 Physiologie

2.1.2 Histologie

2.2 Schilddrüsenfunktion und ihre Beeinflussung durch natürliche exogene Faktoren

2.2.1 Natürlich vorkommende schilddrüsenhemmende (antithyreoide) Substanzen

2.2.2 Klimatische Einflüsse wie Jahreszeit und Umgebungstemperatur

2.2.3 Energieversorgung

2.2.4 Höhenlage

2.3 Schilddrüsentätigkeit und deren Beeinflussung durch thyreostatisch wirksame Medikamente

2.3.1 Wirkungsmechanismen von Thyreostatika

2.3.2 Folgen von verminderten T_3- und T_4-Plasmakonzentrationen auf den Organismus

2.3.3 Histologische Veränderungen der Schilddrüse nach Thyreostatikaverfütterung

2.4 Nachweis einer missbräuchlichen Anwendung von Thyreostatika

2.4.1 Direkter Nachweis

2.4.2 Indirekter Nachweis

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

3.1.1 ELISA- und RIA-Verfahren zur Bestimmung von T_3 und T_4

3.1.2 Nachweis von MTU und MU mittels der Dünnschichtchromatographie (DC)

3.1.3 Hämatologische Untersuchungen

3.1.4 Experimentelle Verfütterung von MTU an Mastrinder

3.1.5 Probenentnahme

3.1.6 Statistische Methoden

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Beurteilung des ELISA zur Bestimmung von T_3 und T_4 (Enzymuntest^R T_3 und T_4) und Uebereinstimmung mit einem RIA-Verfahren

3.2.2 T_3- und T_4-Bestimmung in Proben, die intra vitam und beim Ausbluten entnommen wurden

3.2.3 Bestimmung von T_3 und T_4 bei Mastrindern unmittelbar vor der Schlachtung

3.2.4 T_3- und T_4-Werte bei Schlachtrindern in Beziehung zum Gesamtgewicht der Schilddrüse

3.2.5 Experimentelle Verfütterung von MTU an Mastrinder

4. DISKUSSION

5. SCHWERPUNKTSUNTERSUCHUNGEN ZUR FESTSTELLUNG EINES THYREOSTATIKAMISSBRAUCHS

6. ZUSAMMENFASSUNG

7. VERDANKUNGEN

8. TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Tabellen 1 bis 5

Abbildungen 1 bis 8

9. LITERATURVERZEICHNIS

Abkürzungen

DC	Dünnschichtchromatographie
EDTA	Aethylendiamintetraessigsäure
EFV	Eidg. Fleischschauverordnung
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie
MU	Methylurazil
MTU	Methylthiourazil
RIA	Radioimmunoassay
s	Standardabweichung
T_3	Triiodthyronin
T_4	Thyroxin
V_k	Variationskoeffizient

1. EINLEITUNG

Der Einsatz thyreostatisch wirksamer Substanzen in der Tierproduktion ist seit 1957 in der Schweiz verboten. Die auf dem Lebensmittelgesetz vom 8. Dezember 1905 fussende eidgenössische Fleischschauverordnung (EFV) in der Fassung vom 11. Oktober 1957 verbietet in Artikel 35 Absatz 2, Schlachttieren Futterzusätze mit oestrogener oder thyreostatischer Wirkung zu verabreichen, um die Beschaffenheit, die Haltbarkeit oder den Fleisch- bzw. Fettansatz zu beeinflussen (38). Nach Artikel 60 der EFV sind Fleisch und Fleischwaren, die solche unzulässigen Stoffe enthalten, vom Verkehr ausgeschlossen.

Der sporadische Thyreostatikamissbrauch zur Verbesserung der Mastergebnisse bei Schlachttieren in der Bundesrepublik Deutschland, in Frankreich und in den Beneluxländern führte auch in der Schweiz zu heftigen Kontroversen mit Konsumentenschutzorganisationen und dem Tierschutz (20, 21a, 21b, 28, 29). Diese Organisationen forderten eine Verschärfung der Ueberwachungsmassnahmen bei Schlachttieren und eine Verbesserung der Nachweismethoden eines Thyreostatikamissbrauches.

Im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung werden zur Zeit zum Nachweis der missbräuchlichen Anwendung von Thyreostatika die Schilddrüsen von Schlachttieren in Anlehnung an die Arbeitsvorschriften des Bundesamtes für Veterinärwesen histologisch untersucht. Die Aussagekraft der

Schilddrüsenhistologie als Nachweismethode für die missbräuchliche Anwendung thyreostatisch wirksamer Substanzen wird kritisch gewertet (14, 21a, 22). Eine hyperplastische Reaktion der Schilddrüse kann nicht nur als Folge illegaler Verabreichung von Thyreostatika, sondern auch spontan nach Verfütterung bestimmter Futterpflanzen (Rübsamen, Kohlarten) oder unter bestimmten Haltungsbedingungen auftreten (14, 22).

Durch Bestimmung von T_4 (Thyroxin) mittels eines Radioimmunassays (RIA) im Blutserum ist es Pohlschmidt und Forschner (21a) gelungen, bei Masttieren Hinweise über Thyreostatikaanwendung zu erhalten. Im Gegensatz zur histologischen Schilddrüsendiagnostik eignet sich diese Untersuchungsmethode auch für den Nachweis eines Thyreostatikamissbrauches bei lebenden Tieren. Allerdings sagen niedrige durch RIA erhobene Hormonspiegel nichts über die Ursache der Veränderungen aus. Daher können diese beiden als Screening-Test gedachten Untersuchungsmethoden forensischen Anforderungen nicht genügen. Die missbräuchliche Anwendung von thyreostatisch wirksamen Substanzen bei Schlachttieren lässt sich nur durch den direkten Nachweis der Thyreostatikarückstände im Tier beweisen.

Ein spezifisches Nachweisverfahren für Methylthiourazil (MTU) wurde mittels Dünnschichtchromatographie entwickelt (21b). Mit diesem Verfahren können pharmakologisch wirksame Mengen von MTU nachgewiesen werden. Es lässt jedoch keine Aussage über das eventuelle Vorhandensein anderer

thyreostatisch wirksamer Substanzen zu. Die Dünnschichtchromatographie ist ohne grössere Schwierigkeiten durchführbar und wirtschaftlich (21b).

Im Gegensatz zum direkten MTU-Nachweis ist die Thyroxinquantifizierung mittels RIA mit erheblichen baulichen und gerätetechnischen Investitionen verbunden. Ferner ist eine Bewilligung für den Umgang mit radioaktiven Stoffen erforderlich. Unter diesen Voraussetzungen sprengen RIA-Untersuchungen den Rahmen der Wirtschaftlichkeit.

Eine weitere, dem RIA ähnliche, immunologische Methode ist der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Bei dieser Methode wird das Antigen nicht radioaktiv, sondern mit Hilfe eines Enzyms markiert. Der grosse Vorteil der ELISA-Methode liegt darin, dass keine kostspieligen Einrichtungen für die Arbeit mit radioaktiven Substanzen zur Verfügung stehen müssen, dass die Einhaltung von Strahlenschutzvorschriften entfällt und der Test gefahrlos in jedem Labor mit den im Handel erhältlichen Testsätzen durchzuführen ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei Schlachtrindern und bei Rindern mit experimentell induzierter Hypothyreose die Brauchbarkeit dieses Enzymimmunassays zu überprüfen. Insbesondere konzentrierten wir uns auf:

1. Bestimmung der Referenzbereiche und Streuung von T_4 und T_3 von Mastrindern bei praxisüblicher Fütterung und Haltung.

2. Bestimmung von T_3 und T_4 bei Schlachtrindern in Beziehung zum Gesamtgewicht der Thyreoidea.

3. Beeinflussung von T_3- und T_4-Werten durch Geschlecht, Jahreszeit, Rasse, Standort bzw. Höhenlage und Tageszeit.

4. Verhalten der T_3- und T_4-Spiegel von Mastbullen unter experimentell mit MTU induzierter Hypothyreose.

5. Dünnschichtchromatographische Nachweismöglichkeiten von MTU- und von Methylurazil (MU)-Rückständen im Blutserum, Muskelsaft, Futtermittel und in der Schilddrüse.

6. Ausarbeitung von Vorschlägen zur Planung von Schwerpunktsuntersuchungen, bzw. Erstellen eines Verbundverfahrens zur Ueberwachung der missbräuchlichen Thyreostatikaanwendung bei Masttieren.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Schilddrüse

2.1.1 Physiologie

Die Schilddrüse mit ihren wichtigsten Hormonen Thyroxin (T_4) und Triiodthyronin (T_3) nimmt in der Regelung des Gesamtstoffwechsels des Säuger-Organismus eine Schlüsselposition ein. Wachstum, Fortpflanzung und Laktation werden neben anderen Hormonen durch die Schilddrüsenhormone beeinflusst (4). Schilddrüsenhormone bewirken eine Förderung der oxidativen Vorgänge und damit des Grundumsatzes (6, 24, 27). Auch beim Rind steht die Schilddrüsenfunktion im Zusammenhang mit zahlreichen Krankheiten und Leistungseinbussen (1, 4, 27).

Vom funktionellen Standpunkt aus kann die Schilddrüse als Organ beschrieben werden, welches das im Blut zirkulierende anorganische Iod konzentriert, oxidiert, in die Schilddrüsenhormone einbaut und diese Hormone durch Anlagerung an Thyreoglobulin vorübergehend in den Schilddrüsenfollikeln speichert (6, 24, 27).

Kontrollorgan der Schilddrüsenfunktion ist der Hypothalamus, der über die Sekretion von Thyreotropin-Releasing-Factor (TRF) im Hypophysenvorderlappen die Synthese und Abgabe von Thyreotropin (TSH) stimuliert. TSH regt sowohl die Aufnahme von Iodid durch die Schilddrüse, wie auch die Oxidation desselben zu molekularem Iod an. Es stimuliert auch den Einbau von Iod in Tyrosin und damit die Synthese

der Hormone T_3 und T_4, die Abtrennung von T_3 und T_4 von Thyreoglobulin und die Abgabe der Schilddrüsenhormone in das Blut. Die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 werden nach Inkretion ins Blut an Thyroxin-bindendes Globulin gebunden, T_4 (nicht aber T_3) in geringen Mengen auch an Albumin und Präalbumin (27). Rund 99,95 % des Plasma-T_4 ist an Protein gebunden, 0,05 % liegt durchschnittlich als freies T_4 vor. T_4 und T_3 sind im Verhältnis von ungefähr 9:1 im Plasma vorhanden. Beide Hormone besitzen biologische Aktivität, wobei T_3 eine grössere und schneller einsetzende Wirkung aufweist. Im allgemeinen ist T_4 nur das Prohormon von T_3, welches vor allem durch Deiodierung von T_4 ausserhalb der Schilddrüse (u.a. in der Leber) gebildet wird. Biologisch aktiv ist nur nicht-proteingebundenes (T_4 und) T_3. Das freiwerdende Iod ist für die weitere Hormonsynthese verfügbar. Die Metaboliten von T_3 und T_4 werden in der Leber konjugiert, via Galle in den Intestinaltrakt ausgeschieden, und zum Teil resorbiert und reutilisiert (27).

2.1.2 Histologie

Die Schilddrüse setzt sich im wesentlichen histologisch aus zwei Zellstrukturen zusammen. Erstens dem Follikel, als Funktionseinheit und vorherrschende Struktur in der Schilddrüse. Er besteht aus einer Reihe flacher oder kubischer Epithelzellen, die das sich homogen oder feinkörnig färbende Kolloid umgeben. An der Begrenzung zu den Epithelzellen kann das Kolloid vereinzelte oder zahlreiche Vakuolen sowie rötlich angefärbte Schollen enthalten.

Zweitens die Parafollikulärzellen oder C-Zellen, die das Calcitonin sezernieren (14, 27).

2.2 Schilddrüsenfunktion und ihre Beeinflussung durch natürliche exogene Faktoren

2.2.1 Natürlich vorkommende schilddrüsenhemmende (antithyreoide) Substanzen

Bei der praxisüblichen Ganzjahresfütterung in der Muniintensivmast besteht das Grundfutter aus Maissilage, Gras-Maissilage und Heu (41). Die als Eiweissquelle zugeführten Kraftfuttermittel setzen sich aus verschiedenen Getreideschrotarten, aus Raps-, Erdnuss- oder Baumwollschrot und aus Sojamehl zusammen. Je nach dem Grundfutter werden diesen Kraftfuttermitteln Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine zugesetzt (41).

Eine Reihe der oben erwähnten Futtermittel enthalten sogenannte antithyreoide oder goiterogene Substanzen, die histologisch nachweisbare, proliferative Veränderungen an der Schilddrüse bewirken (14, 22). So wurden goiterogene Substanzen durch Hoppe et al. in Rübsamen und durch Hemken in Maissilage nachgewiesen (zitiert nach Ref. 22). Pottie zeigte 1977 in seinen Untersuchungen, dass Körnermais bei Wiederkäuern stärker thyreostatisch wirkt als Maissilage (22). Die Anwesenheit natürlich vorkommender antithyreoider Stoffe im Tierfutter können in der Schilddrüse erwachsener Rinder folgende pathologisch-histologische Epithelveränderungen verursachen: die kubischen Schilddrüsenzellen nehmen zylindrische Form an, liegen aber noch in einem

einschichtigen Zellverband (Stadium I nach Griem). An einzelnen Stellen des zylindrischen Drüsenepithels kommt es zu Zellproliferation mit Vordringen in die Follikellumina, so dass polypöse oder papillomartige Zellverbände entstehen (Stadium II nach Griem) (22).

2.2.2 Klimatische Einflüsse wie Jahreszeit und Umgebungstemperatur

Hohe Umgebungstemperaturen setzen die Schilddrüsenfunktion herab (30). Jahres- und tageszeitliche Schwankungen im Thyroxinspiegel wurden bei Kaninchen beschrieben (17). Hypothyreotische Zustände, wie sie unter missbräuchlicher Anwendung von Thyreostatika auftreten, wurden aber auch bei extremer Hitze nicht gefunden (21b, 30). Relativ hohe Schilddrüsenhormonwerte können bei frischgeborenen Kälbern und Lämmern im Winter gefunden werden (5). Diese Hormonwerte stehen vermutlich im Zusammenhang mit den Erfordernissen der Wärmeregulation und erlauben das Ueberstehen eines Kältestresses (4).

2.2.3 Energieversorgung

Beim Wiederkäuer führt mehrtägiges Hungern zu einem signifikanten Abfall der Plasmakonzentrationen von T_3 und T_4 (2, 3, 4). Während der Wiederauffütterung zeigt das T_3 einen vorübergehenden Anstieg, bleibt dann aber im Bereich normaler Konzentrationen. Die Bedeutung tiefer Schilddrüsenhormonkonzentrationen während Hungerperioden dürfte u.a. darin liegen, dass neben erheblicher Senkung des

Stoffwechselgrundumsatzes eine verminderte Wärmeproduktion stattfindet und somit Energie gespart wird (2, 3, 12).

2.2.4 Höhenlage

Gealpte Tiere zeigen analog den hungernden und energetisch nur gemäss Erhaltungsbedarf gefütterten Tieren einen Abfall der T_3- und T_4-Spiegel. Der in grösseren Höhen (± 2000 m ü.M.) verminderte Sauerstoffdruck könnte zusätzlich zur energetischen Unterversorgung (vor allem ungenügendes Futterangebot) für die geringere Schilddrüsentätigkeit bzw. für die tiefen, zirkulierenden T_3-Konzentrationen verantwortlich sein (3, 9, 16).

2.3 Schilddrüsentätigkeit und deren Beeinflussung durch thyreostatisch wirksame Medikamente

Thyreostatika nennt man Stoffe, welche die Schilddrüsenhormonsynthese hemmen. Entdeckt wurden diese häufig in Nahrungs- und Futtermitteln vorkommenden Hemmstoffe bei Kaninchen, die nach Kohlfütterung ungewöhnlich grosse Kröpfe entwickelten (14).

2.3.1 Wirkungsmechanismen von Thyreostatika

Der Eingriff antithyreoidaler Substanzen in die Schilddrüsenhormonbildung erfolgt auf verschiedene Weise (6, 14, 24, 26):

1. Hemmung des Iodidtransportes in die Schilddrüse durch einwertige Ionen mit ähnlichem Ionenradius wie z.B. Thiozyanate, Nitrate und Perchlorate.

2. Thiourazil und ähnliche Verbindungen hemmen die Peroxidase der Schilddrüse, welche Iodionen zu Iod oxidieren. Hierdurch wird der Einbau des Iods in das Tyrosinmolekül und damit die Hormonsynthese gehemmt.
3. Gewisse Stoffe hemmen unspezifisch, indem sie als "Iodfänger" selbst iodiert werden und anstelle von Tyrosin treten. Hierzu gehören eine Anzahl aromatischer Substanzen, sogenannte "aromatic thyroid inhibitors" wie Phenole, p-Aminobenzoesäure, Resorcin.
4. Grosse Iodidgaben wirken antithyreoid. Hier liegt bezüglich des Schilddrüsenparenchyms eine echte thyreostatische Wirkung durch Hemmung der TSH-Bildung vor.

Die missbräuchlich in der Rindermast am häufigsten verwendeten Thyreostatika sind schwefelhaltige Verbindungen (14, 32, 33). Vor allem werden die Derivate des Thiourazils (speziell Methylthiourazil (MTU), Propylthiourazil, Phenylthiourazil) neben den Imidazol-, Karbimazol- und Thiamazolderivaten eingesetzt. Ihre pharmakologische Wirkung nimmt in der genannten Reihenfolge zu, ihr Einsatz aber wegen Dosierungsschwierigkeiten ab.

2.3.2 Folgen von verminderten T_3- und T_4-Plasmakonzentrationen auf den Organismus

Die Verfütterung von Thyreostatika führt gegenüber Kontrolltieren zu erhöhten Gewichtszunahmen (10, 22, 26, 32, 33). Diese vermehrten Zuwachsraten sind begleitet von einem erniedrigten Grundumsatz (14, 28, 32, 33) und zu einem unwesentlichen Teil von einer besseren Stickstoff-

retention (14). Ein grosser Teil des erhöhten Lebendgewichtes bei den Schlachttieren beruht auf einer übermässig starken Füllung des Magen- und Darmtraktes. Für diese vermehrte Füllung ist die unter Thyreostatika herabgesetzte Reizbarkeit des vegetativen Nervensystems verantwortlich, durch welche die Darmperistaltik verlangsamt wird (28). Gleichzeitig wird durch eine vermehrte Wassereinlagerung ins Gewebe eine echte Gewichtszunahme vorgetäuscht (10, 32, 33).

2.3.3 Histologische Veränderungen der Schilddrüse nach Thyreostatikaverfütterung

Nach Thyreostatikaverfütterung lassen sich in der Schilddrüse histologische Merkmale einer Anpassung an die Unterfunktion nachweisen, gekennzeichnet durch eine Hyperplasie des Epithels und einen Kolloidschwund innerhalb der Follikel (14, 15, 22, 24). Griem teilte diese Veränderungen in vier Stadien ein, wobei er vom Follikel als Arbeitseinheit ausging (15).

Das Stadium I ist gekennzeichnet durch ein zylindrisches Schilddrüsenepithel, durch ein sich bei der HE-Färbung nur noch blassrosarot angefärbtes Kolloid und durch zahlreiche, am Rande liegende Vakuolen.
Das Stadium II weist an einigen Stellen Zellpolster (sogenannte Sanderson'sche Polster) auf, die als polypös oder papillomartig wachsende Zellproliferationen in die Follikellumina eindringen können. Das Kolloid ist in diesem und

in den darauffolgenden Stadien in der Regel bereits schollig entartet.
Im Stadium III sind die Drüsenzellen an einzelnen oder mehreren Stellen mehrschichtig angeordnet. Die Follikelbläschen verlieren ihr rundes Aussehen und nehmen eine polymorphe Gestalt an.
Im Stadium IV nimmt das Drüsengewebe ein fast kompaktes Aussehen an. Hier verläuft das Wachstum der Drüsenepithelien derart stürmisch, dass es zur Bildung eines mehrschichtigen Epithels kommt. Die Follikellumina sind zu mehr oder weniger breiten Spalten zusammengeschrumpft.

Die Schilddrüsenveränderungen sind in der Regel nicht einheitlich auf das gesamte Drüsengewebe verteilt, was eine Gesamtbeurteilung erschwert (14). In den zentralen Bezirken der Schilddrüsenlappen sind die Epithelien hochgradiger verändert als in den peripheren Schilddrüsenbezirken.

Die oben beschriebenen Veränderungen der Schilddrüse können nicht allein nach Verfütterung von Thyreostatika auftreten, sondern sind auch bei verschiedenen Schilddrüsenerkrankungen gefunden worden (1, 14, 19, 22, 23, 25, 27). Neben dem thyreotropen Hormon (TSH) und Fütterungsfaktoren (vergleiche Kap. 2.2) kann der Funktionszustand der Schilddrüse ausserdem durch den "long acting thyroid stimulator (LATS)", einen Exophthalmus produzierenden Faktor (EPF), einen TSH-Releasing factor und pinealen Faktoren bestimmt werden (14).

Nach langzeitiger Verfütterung von Thyreostatika konnten nach der Literaturzusammenstellung von Dontenwill im Tierversuch sowohl gutartige als auch bösartige Geschwülste der Schilddrüse experimentell erzeugt werden (34). Die Thyreostatika, im speziellen die Thiourazilderivate, wirken offenbar nicht direkt kanzerogen, sondern indirekt durch Störung des natürlichen Rückkopplungssystems zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Schilddrüse. Durch die Funktionsstörungen im Zentralnervensystem können morphologische Veränderungen auch in anderen Organen wie den Nebennieren auftreten (42). Die Möglichkeit einer gesundheitlichen Schädigung des Menschen durch toxische Wirkungen kleinster, analytisch nicht erfassbarer Thyreostatikamengen im Fleisch bei langandauernder Zufuhr darf nicht völlig ausser Betracht gelassen werden (18). Eine Gesundheitsschädigung durch Abbauprodukte von Thyreostatika kann zur Zeit ebenfalls nicht ausgeschlossen werden (14).

2.4 Nachweis einer missbräuchlichen Anwendung von Thyreostatika

2.4.1 Direkter Nachweis

Als Methoden der Wahl für den direkten Nachweis einer missbräuchlichen Anwendung von Thyreostatika in der Rindermast erwiesen sich die verschiedenen Formen der Chromatographie (7, 14, 20, 21b, 31). In älteren Analysenverfahren werden nach Extraktion und chromatographischer Reinigung der Proben mit dem Grothe-Reagenz oder mit Dichlor-Chinon-Chlorimid Thyreostatikarückstände colorimetrisch erfasst (7, 14). Für diese Methoden liegt die untere Nach-

weisgrenze bei 0,4 ppm im Frischgewebe, die bei einer Ausnüchterungszeit von 24 Stunden bereits unterschritten wird (7). Böhnel konnte bis 60 Stunden nach dem Absetzen von Thyreostatika (10 mg MTU pro kg KGW) in der Schilddrüse lokalisierte Residuen auf chemischem Wege feststellen (7).

In den letzten Jahren hat sich die Dünnschichtchromatographie als geeignetstes Nachweisverfahren für Thyreostatika erwiesen (20, 21b). Als Untersuchungsmedium eignen sich aufgrund der einfachen Extraktion Blutserum und Organtropfsäfte (Muskulatur, Schilddrüse). Die Empfindlichkeit dieser Methoden kann mit Hilfe eines Sprühreagenzes (Kaliumhexazyanoferat-III und Eisen-III-chlorid-Lösung) beträchtlich erhöht werden. Sie liegt für das meistverwendete Thyreostatikum MTU bei 50-100 ng (21b). Neben MTU ist diese Methode auch für den Nachweis von Thiourazil, Propylthiourazil und Merkapto-Imidazol geeignet.

Nach Pohlschmidt und Forschner lassen sich Thyreostatika ausser durch Dünnschichtchromatographie auch mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) und Massenspektroskopie nachweisen. Diese Methoden sind zwar etwas empfindlicher, erfordern jedoch teure Geräte und ein erhebliches Fachwissen; zudem sind sie arbeitsintensiver als die Dünnschichtchromatographie (21b).

Nach Absetzen einer länger dauernden, den Gewichtszuwachs begünstigenden Verabreichung von rund 5 g pro Masttier und Tag verschwindet MTU relativ rasch aus dem Blut. Schon

nach 2 Tagen lässt sich MTU und das Abbauprodukt MU im Blutplasma und in der Muskulatur nicht mehr nachweisen (21b). Dagegen persistiert MTU und MU in der Schilddrüse etwas länger: hier gelingt der Nachweis noch bis zu 48 Stunden, in Einzelfällen evt. auch länger, wenn im Plasma bereits kein MTU mehr zu finden ist (21b).

2.4.2 Indirekter Nachweis

a) Indirekter Nachweis mittels Histologie

Bereits Griem (14) stellte bei seinen Untersuchungen an Rindern und Kaninchen fest, dass die histologischen Veränderungen der Schilddrüse nach der Verfütterung von Thyreostatika (vergleiche Kapitel 2.3.3) nicht als spezifisch angesehen werden dürfen. Neben verschiedenen Schilddrüsenerkrankungen treten auch nach Verabreichung antithyreoider (goiterogener) Stoffe im Tierfutter vergleichbare Epithelveränderungen in der Schilddrüse auf (14, 20). Somit stellt die histologische Untersuchung der Schilddrüse für den Nachweis einer Verfütterung von thyreostatischen Mastfuttermitteln einen wertvollen Screening-Test dar, der allerdings nur in Verbindung mit dem chemischen Thyreostatikanachweis im forensischen Sinne beweiskräftig werden kann.

Diese Aussage wurde von Pottie (22) bestätigt. Seine Untersuchungen wiesen auf die Anwesenheit natürlicher goiterogener Stoffe im Tierfutter (Mais mit 5 % zusätzlichen Rübsamen) hin. Die durch solche Fütterung hervorgerufenen Veränderungen in der Schilddrüse erwachsener Rinder stimm-

ten mit den durch MTU induzierten überein (Stadien I und II nach Griem (14)). Wegen der mangelnden Spezifität eignet sich die histologische Untersuchung also nicht zum Nachweis einer missbräuchlichen Anwendung von Thyreostatika.

Durch Thyreostatika-Verabreichung nimmt das Gewicht der ganzen Schilddrüse zu (20). Da aber das Schilddrüsengewicht von verschiedenen Faktoren wie Gewicht der Tiere, Fütterung und Haltung sowie Dosierung der illegal angewendeten Thyreostatika abhängt, ist auch hier ein exakter Rückschluss auf MTU-Verfütterung problematisch (14, 20, 31). Immerhin wurden sehr hohe Thyreoideagewichte (über 60 g) mit wenigen Ausnahmen nur bei nachgewiesener Thyreostatikaverfütterung gefunden (20, 31).

b) Indirekter Nachweis durch Bestimmung von T_3 und T_4

Das eiweissgebundene Iod (PBI = Protein bound iodine) war lange Zeit der einzige unter Praxisbedingungen bestimmbare labordiagnostische Parameter beim Rind, der eine Aussage über die Schilddrüsenfunkton erlaubte (23). Die Bestimmung des PBI ist aufwendig und bei Tieren nicht immer zuverlässig, weshalb diese Methode als einfacher Screening-Test keine Bedeutung erhielt (1).

Die freie Bindungskapazität der Serumproteine für Schilddrüsenhormone kann bestimmt werden. Nach Schneider und Rosenmund ist dieser in der Humanmedizin entwickelte Test nicht auf das Rind übertragbar (25).

Als Alternative zu den oben genannten Methoden bot sich die Bestimmung des Gesamtthyroxins mit Hilfe der kompetitiven Eiweissbindungsanalyse an. Eine von Bischoff und Schneider (1975) angewandte Methode erwies sich als ungeeignet (1).

Andere Methoden wie die Bestimmung des BEI (Butanol extrahierbares Iod) oder der 131-Iod-Aufnahmetest bzw. die Bestimmung der funktionellen Iod-Aufnahmekapazität durch die Schilddrüse wie auch die Bestimmung des Grundumsatzes fanden in der Veterinärmedizin keine Verwendung (27).

Pohlschmidt und Forschner bestimmten mittels RIA Thyroxin im Blut von Masttieren (21a). An einem Bullenkollektiv, welchem ohne jegliche Aenderung des Futterplanes täglich die praxisempfohlene Dosis des Thyreostatikums MTU von 5 g mit dem Kraftfutter verabreicht wurde, konnte durch die Bestimmung von Thyroxin Beginn und Ende der pharmakologischen MTU-Wirkung dargestellt werden. Die Thyroxinwerte unterschritten während der zweiten Woche den Grenzwert von 4 µg pro 100 ml (= 51.5 nmol/l) Serum. Nach Absetzen des Wirkstoffes MTU erreichten die Thyroxinwerte innerhalb von 4 Tagen wieder Normalwerte. Mit den in den erwähnten Arbeiten verwendeten RIA Methoden lassen sich T_3- und T_4-Werte präzise bestimmen.

Seit kurzer Zeit sind EIA's zur Messung von T_3 und T_4 auf dem Markt erhältlich. Dabei fanden zwei heterogene Enzymimmunoassays Anwendung, welche sich im Vergleich mit RIA's bezüglich Präzision und Richtigkeit bewährt haben (8, 37).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

3.1.1 ELISA- und RIA Verfahren zur Bestimmung von T_3 und T_4

Die vorliegende Arbeit hatte zum Hauptziel, die Verwendbarkeit eines kommerziell erhältlichen ELISA's[1] zur Bestimmung von T_3 und T_4 abzuklären. Dieser Test beruht auf dem Kompetitionsprinzip. Dabei sind die Oberflächen von Polystyrolröhrchen mit T_3- resp. T_4-spezifischen Antikörpern beschichtet. Zur Durchführung des Tests werden definierte Mengen des zu testenden Serums und eines enzym-markierten T_3- resp. T_4-Standards in die Röhrchen pipettiert. Während der Inkubationsphase binden die an der Röhrchenoberfläche haftenden Antikörper das in der Probe enthaltene nicht-markierte und das enzym-markierte Hormon. Je mehr Hormon in der Probe oder in den Standards vorhanden ist, desto weniger enzym-markiertes Hormon bleibt am Röhrchen haften. Durch Zugabe eines geeigneten Substrates kommt es zu einer Farbentwicklung im Röhrchen, deren Intensität mit einem Photometer gemessen werden kann. Die Messungen wurden entsprechend den Herstellervorschriften durchgeführt. Genauere Angaben über das Testprinzip, über die Gebrauchslösungen (Inkubationspuffer, T_3/T_4-POD-Konjugat, Substrat--Puffer, Substrat ABTS^R, Standards, Kontrollseren), über Farbstoffe sowie über Wellenlängen sind aus dem Anhang Immundiagnostica Enzymun-Test^R T_3/T_4 ersichtlich. Die

---

[1]) Enzymun-Test^R T_4/T_3 der Firma Boehringer, D-Mannheim, Vertretung durch Boehringer, Mannheim (Schweiz), Industriestrasse, 6343 Rotkreuz

Spezifität des verwendeten T_3-/T_4-Antikörpers wurde in vitro geprüft. Die Kreuzreaktionen können aus dem Hinweiszettel im Anhang entnommen werden.

Zur Ueberprüfung dieses ELISA-Verfahrens wurden T_3- und T_4-Konzentrationen in Blutproben von Rindern mit einem RIA-Verfahren (44) verglichen.

3.1.2 Nachweis von MTU und MU mittels der Dünnschichtchromatografie (DC)

Der Nachweis von MTU und MU aus dem Serum und Muskelsaft wurde mittels DC entsprechend den Angaben von Pohlschmidt und Forschner durchgeführt (21b). Die Grenze sicherer Nachweismöglichkeiten mittels DC liegt bei 50-100 ng MTU absolut.

3.1.3 Hämatologische Untersuchungen

Im Verlauf einer experimentellen Verfütterung von MTU wurden am Veterinär-Medizinischen Labor der Universität Zürich der Hämatokrit, das Hämoglobin, die Erythrozytenzahl und die Leukozytenzahl bestimmt und eine Differenzierung der Leukozyten vorgenommen.

3.1.4 Experimentelle Verfütterung von MTU an Mastrinder

In einem Hauptversuch wurde bei einer Gruppe von Mastochsen das Verhalten der Plasmakonzentrationen der Schilddrüsenhormone unter dem Einfluss eines Thyreostatikums verfolgt. Dabei wurde MTU eingesetzt, da MTU als sehr wirksames und preisgünstiges Medikament in der Praxis fast ausschliesslich zum Einsatz kommen dürfte. Dieser Versuch

wurde an der kantonalen landwirtschaftlichen Schule Strickhof durchgeführt mit Unterstützung von Herrn Direktor G. Müller und Mitarbeitern. Zehn Braunvieh-Mastochsen mit einem Gewicht von 370 bis 435 kg wurden in zwei getrennt gehaltene Gruppen à 5 Tiere eingeteilt.

Die Tiere der Gruppe 1 erhielten in der Kraftfutterration täglich 5 g MTU pro Tier. Die Beimischung von MTU zum Kraftfutter wurde durch die Zanovit AG, Gipf-Oberfrick, vorgenommen. Die Tiere der Gruppe 2 dienten als Kontrollen. Sie erhielten die gleiche Kraftfutterration wie die Gruppe 1, aber ohne MTU. MTU wurde über 26 Tage verabreicht. An den Tagen 1, 7, 14, 21, 28 und 31 ab Versuchsbeginn wurde den 5 Versuchstieren jeweils nach der Fütterung sowie vor der Schlachtung am 33. Tage eine Blutprobe entnommen, aus welcher die Konzentration von T_3 und T_4 ermittelt wurde. Die Blutentnahmen bei den Kontrolltieren erfolgte an den Tagen 7, 21 und am Schlachttag (Tag 33).

Einmal wöchentlich wurden alle 10 Tiere gewogen. Unmittelbar nach der Schlachtung wurden die Schilddrüsen entnommen und das Gewicht bestimmt. Ein Teil der Schilddrüsen wurde jeweils für die histologische Untersuchung in Formalin (4 %) fixiert, der Rest bei -20°C für den Nachweis von MTU eingefroren.

3.1.5 Probenentnahme

Zur Blutentnahme wurden die Tiere in der Wägebox bzw. Tötebucht mittels eines Hornseiles fixiert. Die Proben wurden durch Punktion der gestauten Vena Jugularis gewon-

nen, wobei das Blut frei in ein Röhrchen fliessen konnte. Drei Stunden nach den Probeentnahmen wurde das Serum gewonnen und daraus T_3 und T_4 bestimmt.

In einem Vorversuch wurde abgeklärt, ob die Blutproben auch anlässlich des Ausblutens entnommen werden könnten. Dazu wurde eine erste Probe intra vitam in der Tötebucht, die zweite am hängenden, ausblutenden Tier gewonnen.

3.1.6 Statistische Methoden

In den Tabellen 1 bis 5 und den Abbildungen 3 und 4 sind die Ergebnisse in Form von Durchschnitten ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (s) dargestellt. Die Mittelwertsvergleiche wurden mit Hilfe des t-Testes (STUDENT) durchgeführt (Sachs). In den Abbildungen 1 und 2 wurden lineare Korrelationskoeffizienten berechnet.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Beurteilung des ELISA zur Bestimmung von T_3 und T_4 (Enzymuntest^R T_3 und T_4) und Uebereinstimmung mit einem RIA-Verfahren

a) Reproduzierbarkeit des ELISA

Um die Reproduzierbarkeit des ELISA zur Bestimmung von T_3 und T_4 beurteilen zu können, wurden von zwei zufällig ausgewählten, unter konventionellen Mastbedingungen aufgezogenen Rindern Blutproben je 10 mal gemessen. Die Resultate sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Der Variationskoeffizient (V_k) ist beim T_3-Test mit rund 3% niedriger als beim T_4-Test (4.94 % resp. 7.28 %). Die Ursachen für diese Differenz sind unbekannt. Die hier gefundenen V_k's stimmen mit publizierten Werten gut überein (8). Da die Reproduzierbarkeit als gut zu betrachten war, verwendeten wir aus Kostengründen in der vorliegenden Untersuchung hauptsächlich Einfachbestimmungen.

b) Streuung der mittels ELISA bestimmten T_3- und T_4-Werte innerhalb zweier Kollektive

Um die physiologische Variabilität der T_3- und T_4-Werte zu bestimmen, wurde T_3 und T_4 in den Blutproben von je 8 männlichen (12 Monate alten) und weiblichen (11 Monate alten) Mastrindern gemessen. Die Probanden wurden in getrennten Buchten gehalten und konventionell mit betriebseigener Gras- und Maissilage sowie mit Heu gefüttert. Die Resultate sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

Aus dem Vergleich der Streuung des Testverfahrens (V_k max. = 7.28 %, siehe Tab. 1) mit der physiologischen Streuung innerhalb der beiden Gruppen (V_k max. = 13.0 %, siehe Tab. 2) kann gefolgert werden, dass die Streuung der Methode wesentlich kleiner ist als die physiologische Streuung.

c) Einfluss des Einfrierens der Proben auf T_3- und T_4-Werte

In der Beschreibung des Enzymun T_3- und T_4-Tests wird angegeben, dass längeres Einfrieren humaner Serumproben einen Einfluss auf die Resultate hätte. Um abzuklären, ob dies auch für Serumproben von Rindern zutrifft, wurden die T_3- und T_4-Werte von 20 Serumproben frisch und nach 8-monatigem Aufbewahren bei -20°C gemessen (Tab. 3). Aus Tab. 3 geht hervor, dass länger dauerndes Einfrieren der Proben zu signifikant höheren T_4-Werten führt. Daher wurden alle in der vorliegenden Untersuchung an Mastrindern vorgenommenen Messungen mit frisch entnommenen Proben sofort durchgeführt.

d) Uebereinstimmung mit einem RIA-Verfahren

Zur Abklärung, ob und wie gut die von uns verwendeten ELISA-Verfahren mit RIA-Methoden übereinstimmten, verwendeten wir T_3- und T_4-Werte von 63 Rinderserumproben, die ebenfalls mittels RIA nach dem von Blum et al. (44) beschriebenen Verfahren gemessen wurden. Die Proben wurden von Rindern gewonnen, die unter verschiedenen Bedingungen gehalten worden waren. Die Resultate dieser Vergleichs-

untersuchung sind in den Abb. 1 und 2 dargestellt.

Aus den Abb. 1 und 2 geht hervor, dass die beiden Methoden mit Korrelationskoeffizienten von r = 0.94 (T_4) und r = 0.89 (T_3) recht gut übereinstimmen. Allerdings waren die mittels RIA bestimmten Werte systematisch niedriger als jene, die mittels ELISA gefunden wurden. Dieser systematische Unterschied könnte daran liegen, dass die Serumproben vor der Messung mittels ELISA während mehrerer Monate eingefroren worden waren (siehe Tabelle 3).

3.2.2 T_3- und T_4-Bestimmung in Proben, die intra vitam und beim Ausbluten entnommen wurden

Die Probenentnahme am ausblutenden, hängenden Tier wäre ideal, weil die Probenentnahme ungefährlich wäre und den Schlachtablauf nicht stören würde. In einem Vorversuch wurde daher abgeklärt, welchen Einfluss die Blutentnahme beim lebenden resp. beim ausblutenden, hängenden Tier auf die T_3- und T_4-Bestimmung hat. In Tabelle 4 sind die Resultate von 8 Probenentnahmepaaren zusammengestellt. Aus Tabelle 4 geht hervor, dass die Probenentnahme einen Einfluss auf die Bestimmung hat: am ausblutenden Tier gewonnene Proben weisen niedrigere T_3- und T_4-Werte auf als Proben, die intra vitam entnommen wurden ($p < 0.05$).

Die tieferen T_3- und T_4-Konzentrationen in den am geschlachteten Tier gewonnenen Proben könnten auf die häufig beobachtete Hämolyse zurückzuführen sein. Nach Angaben des Herstellers soll hämolytisches Serum für den T_3-Test nicht eingesetzt werden. In der Anleitung des Herstellers zur Durchführung des T_4-Tests wird der Hämolyse keine Bedeutung beigemessen. Unsere Beobachtungen zeigen aber, dass wenigstens beim Rind aus hämolytischen Proben auch T_4 nicht zuverlässig bestimmt werden kann.

Aufgrund der in diesem Experiment gefundenen Werte wurden sämtliche Proben der vorliegenden Untersuchung am lebenden Tier gewonnen.

3.2.3 Bestimmung von T_3 und T_4 bei Masttieren unmittelbar vor der Schlachtung

Der missbräuchliche Thyreostatikaeinsatz ist für den Mäster vor allem in den letzten Wochen der Mast lohnend. Daher haben wir unsere Bestimmungen der Normalwerte von T_3 und T_4 auf den Zeitpunkt vor der Schlachtung beschränkt. Um allfällige Einflüsse der Aussentemperatur erkennen zu können, wurden im Winter, Frühjahr und Sommer von insgesamt 164 Mastrindern aus 14 Beständen unmittelbar vor der Schlachtung Blutproben entnommen und daraus T_3 und T_4 bestimmt. Die klinische Untersuchung ergab bei keinem der Tiere Hinweise auf missbräuchliche Anwendung von Thyreostatika. Die Resultate sind in Abb. 3 und Abb. 4 zusammengestellt.

a. Die mittleren T_3- und T_4-Werte aller 164 Tiere betrugen im Durchschnitt 5.36 nmol/l bzw. 137.12 nmol/l.
   Die Minimal- und Maximalwerte betrugen 2.1 nmol/l und 10.7 nmol/l für T_3 und 87 nmol/l und 322 nmol/l für T_4.
b. Für eine Gruppe von 4 Schwarzflecktieren wurden im Juli 1983 wesentlich höhere T_3-Werte gegenüber dem Durchschnitt gefunden: 7,9 bis 10,5 nmol/l.
c. Die Werte von T_3 wiesen eine grössere Streuung auf als jene von T_4.
d. Es bestanden geringe rassen- sowie geschlechtsspezifische Unterschiede der T_3- und T_4-Werte. So wiesen Tiere der Simmenthaler/Red Holstein-Rasse eher etwas niedrigere Werte auf als Tiere der Rassen Schwarzfleck oder Braunvieh. Zudem lagen die Werte weiblicher Tiere unter denjenigen der männlichen.
e. Die T_3- und T_4-Werte waren sowohl bei "kalter" als auch "warmer" Aussentemperatur recht konstant.

3.2.4 T_3 und T_4-Werte bei Schlachtrindern in Beziehung zum Gesamtgewicht der Schilddrüse

Bei 14 Tieren wurde bei der Schlachtung die Schilddrüse entnommen und nach Wegpräparieren von Fett gewogen. Mittelwert und Standardabweichung betrugen 36.3 ± 9.2 g. Zwei Schilddrüsen lagen mit 55 g bzw. 49 g deutlich über dem Mittelwert. Die histologische Untersuchung[2)] ergab bei diesen beiden Drüsen aber keinen Hinweis auf Anwendung von

---

[2)] Freundlicherweise von Herrn Kollegen Crameri, Institut für Veterinärpathologie, durchgeführt

Thyreostatika. Es soll im Rahmen einer gesonderten Arbeit darüber berichtet werden.

Zwischen dem Gewicht der Schilddrüsen und den T_3- und T_4-Werten bestand keine Korrelation (Abb. 5).

3.2.5 Experimentelle Verfütterung von MTU an Mastrinder

Die Verabreichung von 5 g MTU pro Tier und Tag hatte zur Folge, dass die Tiere nach rund 14 Tagen etwas ruhiger wurden. Gleichzeitig fiel bei diesen Tieren eine Umfangsvermehrung und eine grössere Fresslust auf.

Die wöchentlich durchgeführten Blutuntersuchungen ergaben weder im weissen noch im roten Blutbild Veränderungen.

Die Schilddrüsengewichte der mit MTU gefütterten Tiere waren signifikant höher als jene der Kontrollen ($\bar{x} \pm s$ = 70 ± 9.4 g gegenüber 34 ± 7.3 g ($P = < 0{,}01$ im t-Test).

a) T_3-Werte im Verlauf von MTU-Verfütterung

Bereits am 7. Tag nach Beginn der MTU-Verabreichung waren die T_3-Werte gegenüber dem Ausgangswert abgesunken. Eine Ausnahme machte das Tier Nr. 9, bei welchem eine Erhöhung gegenüber dem Ausgangswert festzustellen war (Abb. 7). Nach dem Absetzen von MTU kam es innerhalb von 5 Tagen bei allen 5 Tieren zu einem markanten, gegenüber dem Ausgangswert über zweifachen Anstieg der T_3-Konzentrationen.

b) T_4-Werte im Verlauf von MTU-Verfütterung

Sieben Tage nach Beginn der MTU-Verabreichung war bei allen 5 Versuchstieren eine gegenüber dem Ausgangswert erhöhte T_4-Konzentration feststellbar. Danach fielen die T_4-Werte aber bis zum Tag 28, also bis 2 Tage nach Absetzen von MTU, markant ab (Abb. 8). Am Tag 28, 2 Tage nach Absetzen von MTU, lagen die T_4-Werte bei allen 5 Tieren unter 50 nmol/l, also deutlich tiefer als die niedrigsten der in Kap. 3.2.3 beobachteten T_4-Werte von normalen Schlachtrindern. Am Tag 31, 5 Tage nach Absetzen von MTU, lagen die T_4-Werte wieder im Bereich der Kontrolltiere und am Tag 33 (Tag der Schlachtung) waren sie auf durchschnittlich 188.4 ± 38.8 nmol/l gestiegen.

c) Nachweis von MTU mittels Dünnschichtchromatographie

In den an den Tagen 7, 14, 21 und 28 entnommenen Serumproben konnte mittels DC nur MU, jedoch kein MTU nachgewiesen werden. In den an den Tagen 31 und 33 entnommenen Serumproben war weder MU noch MTU nachweisbar.

Von den Versuchs- und den Kontrolltieren wurden Muskelproben eingefroren und wieder aufgetaut; der beim Auftauen austretende Fleischsaft wurde ebenfalls mittels DC analysiert. In keiner von 13 untersuchten Proben konnte MTU oder MU nachgewiesen werden.

Auch in 8 Schilddrüsenproben (5 Versuchstiere, 3 Kontrolltiere) konnte weder MU noch MTU gefunden werden. Dagegen war MTU und MU im mit MTU angereicherten Kraftfutter nachweisbar.

d) Gewichtszunahmen im Verlauf der MTU-Verfütterung

Die Messdaten sind in Tab. 5 festgehalten und in Abb. 6 graphisch dargestellt. Die durchschnittliche Tageszunahme der Kontrolltiere betrug 1,42 kg. In der gleichen Zeitspanne betrug die durchschnittliche Zunahme der Versuchstiere 1,83 kg. Während der Ausnüchterungsphase bis zur Schlachtung 5 Tage nach Versuchsende haben die Versuchstiere durchschnittlich 1,2 kg an Gewicht verloren.

4. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, einen kommerziell erhältlichen Enzymimmunoassay bezüglich seiner Verwendbarkeit zur Bestimmung von T_3 und T_4 beim Rind zu überprüfen. Im Besonderen sollte dabei die Frage geklärt werden, ob sich mittels dieser Testmethode eine missbräuchliche Verabreichung von Thyreostatika an Mastrinder erkennen lässt. Zur Beantwortung dieser Fragestellung war es notwendig, verschiedene technische Aspekte des Testverfahrens zu untersuchen, Referenzwerte von T_3 und T_4 an einer grösseren Zahl von Schlachtrindern zu bestimmen sowie T_3-und T_4-Werte im Verlauf einer experimentellen Verfütterung des unter Praxisbedingungen wohl am ehesten verwendeten Thyreostatikums MTU zu messen.

Aus den durchgeführten Experimenten kann gefolgert werden, dass der verwendete Enzymun-Test^R T_3 und T_4 auch mit Rinderserum einfach und problemlos durchzuführen ist, eine gute Reproduzierbarkeit aufweist und mit RIA-Methoden gut korreliert. Allerdings bestehen Unterschiede bezüglich der durch EIA's bzw. durch RIA's erhaltenen absoluten Konzentrationen, was eine weitere Ueberprüfung der "Richtigkeit" der Methode erfordert. Die in der Humanmedizin gemachten Laborerfahrungen (8) gelten auch für das Rind.

Nach länger dauerndem Einfrieren werden in den Proben höhere T_3- und T_4-Werte gemessen als in frischem Material. Diese Beobachtung stimmt mit der im Testkit enthaltenen Gebrauchsanweisung überein, nach welcher T_3 und T_4

nur während 4 Wochen gefroren gelagert werden können. Der Umstand der unsicheren Lagerstabilität ist für die vorliegende Fragestellung insofern von Bedeutung, als Proben mit tiefen T_4-Werten aus forensischen Gründen möglichst lange haltbar sein sollten. Die Frage, wie lange Rinderserum ohne wesentliche Aenderungen der T_3- und T_4-Werte gelagert werden kann, wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht abgeklärt.

Die Probenentnahme während des Ausblutens beim hängenden Tier ist nicht möglich, da das so entnommene Serum meistens mehr oder weniger hämolytisch ist und Hämolyse die Messung stört. Daher sollte die Serumgewinnung ausschliesslich am lebenden Tier vorgenommen werden.

Die Resultate der T_3- und T_4-Bestimmung unmittelbar vor der Schlachtung stimmten gut mit jenen in der Literatur überein (21a). Auch die Streuung - charakterisiert durch die Standardabweichung - war bei den verschiedenen Rassen und unterschiedlichen Aussentemperaturen nicht stark verschieden. Für die grössere Variabilität der T_3-Werte dürften vor allem Fütterungseffekte (spez. eine energetische Unterversorgung) verantwortlich gemacht werden, welche die T_3-Konzentration wesentlich stärker beeinflussen als die T_4-Konzentration (2, 3). Diese Abhängigkeit der T_3-Plasmakonzentration von der Verfügbarkeit von Kohlehydraten gibt nach neueren Erkenntnissen neben anderen Parametern, wie z.B. Glukose, Hinweise über die Stoffwechsellage, insbesondere über den Energiestoffwechsel eines Tieres.

Eine Erklärung für die wesentlich höheren T_3-Werte der 4 Schwarzflecktiere im Juli 1983 kann nicht gegeben werden. Grosse Hitze in jenem Juli dürfe jedoch als Ursache für eine erhöhte Aktivität der Schilddrüse kaum in Frage kommen, da hohe Aussentemperaturen zu einer Verringerung der Thyreoidea-Aktivität führen (30). Am ehesten kommen oben erwähnte Fütterungsfaktoren und/oder ungewöhnliche Haltungs- und Transportbedingungen als mögliche Erklärung für diese Steigerung in Frage. Die entsprechenden T_4-Werte waren nur mässig erhöht. Diese Beobachtung stimmt auch mit publizierten Angaben überein, wonach T_3 rascheren und grösseren Variationen unterworfen ist als T_4 (4, 27).

Unter den unmittelbar vor der Schlachtung gewonnenen Serumproben befand sich keine mit derart tiefen T_3- und T_4-Werten, dass eine missbräuchliche Anwendung von Thyreostatika hätte vermutet werden müssen. Die tiefsten T_4-Werte lagen deutlich über jenen, die durch MTU-Verfütterung erzielt wurden, während die tiefsten T_3-Werte im Bereich der experimentellen Hypothyreose lagen (siehe Kap.3.2.5).

Anhand der Probenentnahme bei Mastrindern unmittelbar vor der Schlachtung konnte ein Referenzbereich für T_3 und T_4 definiert werden. Aus den Berechnungen kann geschlossen werden, dass T_3 und T_4 normal verteilt sind.

Aus dem Verlauf der 5 Kurven von Abb. 7 kann geschlossen werden, dass unter MTU-Einwirkung die T_3-Werte zwar prinzipiell absinken, allerdings nur mässig, und dass individuelle Schwankungen einzelner Tiere erheblich sind. Aus diesem Grund erscheint die Bestimmung von T_3 kaum geeignet, eine missbräuchliche Anwendung von Thyreostatika zu diagnostizieren.

Die Verabreichung von MTU führte bei allen Tieren zu einem eindeutigen Absinken der T_4-Werte (Abb. 8). Die Chancen, mittels T_4-Messung Fälle von Thyreostatikamissbrauch zu erkennen, können als gut beurteilt werden. Falls ein Mäster mittels MTU oder eines anderen Thyreostatikums einen erhöhten Zuwachs wirtschaftlich ausnutzen will, muss er dieses bis 2 Tage vor der Schlachtung verabreichen (Abb. 6). Wird das Thyreostatikum früher als 2 bis 3 Tage vor der Schlachtung abgesetzt, verlieren die Tiere wieder an Gewicht, eine Beobachtung, die auch in den vorliegenden Experimenten gemacht wurde. Gerade in der für den Mäster potentiell gewinnbringenden Phase der Ausmast (während der Verabreichung des Thyreostatikums inklusive 2-3 Tage nach Absetzen desselben) erreichen die T_4-Konzentrationen sehr tiefe Werte (bis unter 50 nmol/l), welche wesentlich unter dem tiefsten beobachteten Wert (87 nmol/l) einer normalen Rinderpopulation lagen. T_4-Werte unter ca. 80 nmol/l müssen daher, bei Anwendung der von uns gebrauchten Methode, als äusserst verdächtig für einen Thyreostatikamissbrauch angesehen werden.

Im Verlauf dieser Untersuchung wurden bei Patienten der Veterinär-Medizinischen Klinik gelegentlich T_3- und T_4-Werte bestimmt. Bei 2 schwerkranken Kümmerern im Alter von unter 10 Monaten wurden ebenfalls sehr tiefe T_3- und T_4-Werte gemessen (Tier 1: T_3 = 3,5 nmol/l, T_4 = 41,2 nmol/l; Tier 2: T_3 = 4,2 nmol/l, T_4 = 51,5 nmol/l). Beide Tiere waren stark verwurmt (Bandwürmer und Magen-Darm-Strongyliden), litten an Bronchopneumonie und waren im Wachstum zurückgeblieben. Die bei diesen Patienten beobachteten T_4-Werte hätten prinzipiell von mit Thyreostatika behandelten Tieren stammen können; das klinische Bild liess aber keine Zweifel offen, dass es sich um schwerkranke Tiere handelte. Auch diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass bei gesunden Mastrindern T_4-Werte unter 80 nmol/l fast nur bei Thyreostatikamissbrauch vorkommen können. Auszuschliessen sind Hypothyreosen und niedrige zirkulierende Schilddrüsenhormonkonzentrationen, bedingt durch Verfütterung bestimmter Futterarten und als Folge energetischer Unterversorgung (2, 3, 9).

In Uebereinstimmung mit Vos et al. sowie Böhnel konnten wir bei den 5 mit MTU behandelten Versuchstieren eine gegenüber den Kontrollen deutliche Gewichtszunahme der Thyreoidea feststellen (7, 31). Vos et al. gaben als obere Grenze für normale Schilddrüsen 60 g an, was unseren Befunden entspricht. Für die Erkennung von Tieren, denen Thyreostatika verabreicht wurden, ist die Gewichtsbestimmung der Thyreoidea somit zusätzlich von einer gewissen Bedeutung; allerdings ist mit falsch positiven und falsch negativen Resultaten zu rechnen (7, 31).

Von Interesse war auch die Frage, ob zwischen dem Gewicht der Schilddrüsen und den T_3- und T_4-Werten eine Beziehung besteht. Bei den normalen Schlachtrindern fanden wir eine positive, jedoch nicht signifikante Korrelation. Bei den mit Thyreostatika behandelten Tieren hätte eine negative Beziehung zwischen T_4 und dem Gesamtgewicht erwartet werden können.

Da durch Bestimmung von T_4 und durch Wägung der Thyreoidea zwar wichtige, aber nur indirekte Hinweise auf Thyreostatikamissbrauch erhältlich sind, drängte sich der direkte Nachweis des Thyreostatikums in Serum, Muskulatur und Organen auf. Wir konnten im Serum während der ganzen Versuchsdauer und bis 2 Tage nach Absetzen des Thyreostatikums mittels der von Pohlschmidt und Forschner empfohlenen DC-Methode MU nachweisen. An den Tagen 31 und 33 (also 5 und 7 Tage nach Absetzen von MTU) gelang der Nachweis nicht mehr, und zwar weder aus dem Serum noch aus der Muskulatur. Auch in den Schilddrüsen konnte am 7. Tag nach dem Absetzen kein MU nachgewiesen werden. Diese Befunde stimmen auch mit Böhnel (7) überein, dem die Extraktion von MTU aus der Schilddrüse nur bis 60 Std. nach dem Absetzen des Medikamentes gelang. Da es in unseren Versuchen darum ging, den Verlauf der T_3- und T_4-Werte zu ermitteln, liess sich die Frage, wie lange MTU und/oder MU in den Schilddrüsen nachweisbar ist, aus versuchstechnischen Gründen nicht beantworten.

Mittels Dünnschichtchromatographie konnten wir im Serum nur MU, jedoch kein MTU nachweisen. Dieser Befund lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass MTU in vivo durch Desulfurierung zu MU abgebaut wird. Dieser Abbaumechanismus ist schon längere Zeit bekannt (43). Ob im Verlauf des von Pohlschmidt und Forschner empfohlenen Extraktionsverfahrens MTU zu MU abgebaut wird, kann zur Zeit nicht beantwortet werden. Immerhin ist denkbar, dass durch eine andere Extraktion und HPLC-Auftrennung MTU nachgewiesen werden kann.

5. SCHWERPUNKTSUNTERSUCHUNGEN ZUR FESTSTELLUNG EINES THYREOSTATIKAMISSBRAUCHS

Gestützt auf die in der vorliegenden Untersuchung gemachten Erfahrungen erscheint die Durchführung von Schwerpunktsuntersuchungen zum Nachweis von Thyreostatikaverfütterung möglich. Dabei kann prinzipiell das nachstehend angegebene Vorgehen vorgeschlagen werden, in welchem allerdings die rechtlichen Aspekte nicht berücksichtigt werden:

1. Eine Equipe bestehend aus einem/einer Tierarzt/Tierärztin und einer/einem Laborantin/Laboranten wird mit einem geeigneten Fahrzeug ausgestattet, das gleichzeitig als einfaches Laboratorium dienen kann. Dieses mobile Labor sollte mit den folgenden Geräten und Gegenständen versehen sein: Zentrifuge, Photometer, Kühlschrank, Pipettierhilfe, Enzymuntest^R T_4 (Boehringer), Material zur Probenentnahme und Probenidentifikation, Kunststoffsäcke.

2. Die Equipe besucht unangemeldet verschiedene Schlachthöfe. Die Durchführung der Untersuchungen ist dabei wie folgt denkbar:
   - Unmittelbar vor der Schlachtung wird dem Tier eine Blutprobe von 20-30 ml entnommen. Zur Antikoagulation wird EDTA verwendet. Die Proben werden sofort zentrifugiert, und das Plasma wird mittels Enzymuntest^R T_4 bezüglich T_4 analysiert.

- Von den in der Zwischenzeit geschlachteten Tieren wird durch den Tierarzt der Equipe die Thyreoidea entnommen. Dies geschieht am einfachsten, indem jener Teil der Trachea entfernt wird, in welchem sich die in Fettgewebe eingebettete Thyreoidea befindet; zu diesem Zeitpunkt braucht die Thyreoidea nicht freipräpariert zu werden. Die Tracheastücke mit den Schilddrüsen werden in Kunststoffsäcke verpackt und gekühlt aufbewahrt.
- Das Resultat der T_4-Wert-Bestimmung liegt nach rund 3-4 Std. vor; bis zu diesem Zeitpunkt darf kein Tierkörper den Schlachthof verlassen. Falls der T_4-Wert bei der von uns angewendeten Methode über 80 nmol/l liegt, besteht kein Verdacht auf einen Thyreostatikamissbrauch. In diesem Fall kann der entsprechende Tierkörper für die weitere Verarbeitung freigegeben und die Thyreoidea sowie die Plasmaprobe weggeworfen werden.
- Liegt der T_4-Wert unter 80 nmol/l, muss mit einem Thyreostatikamissbrauch gerechnet werden. In diesem Fall sollte/sollten der/die Tierkörper des betreffenden Mästers vorübergehend konfisziert werden. Nun werden die zugehörigen Schilddrüsen freipräpariert. Der eine Lappen sollte an ein spezialisiertes Labor zum direkten Nachweis von Thyreostatika weitergeleitet werden, während der andere Lappen in 4 % Formalin für die pathologisch-anatomische Untersuchung fixiert wird.

- Da bei T_4-Werten unter 80 nmol/l der begründete Verdacht auf einen Thyreostatikamissbrauch vorliegt, erscheint es angezeigt, dass bei den anderen Masttieren auf dem Hof des betreffenden Mästers ebenfalls Blutproben entnommen und bezüglich T_4 analysiert werden. Gleichzeitig sollten Futterproben entnommen und in einem Speziallabor auf MTU und andere Thyreostatika untersucht werden. Es ist denkbar, dass der Mäster zu diesem Zeitpunkt den Missbrauch zugibt. Er muss nämlich damit rechnen, dass er neben den bisherigen auch noch die zukünftigen Analysenkosten übernehmen muss. Falls der Mäster den Missbrauch nicht zugibt, aber tatsächlich Thyreostatika anwendet, wird er diese nach Bekanntwerden der tiefen T_4-Befunde und der damit verbundenen Massnahmen verschwinden lassen.

Es ist also damit zu rechnen, dass in den Futterproben keine Thyreostatika nachzuweisen sind und dass der Mäster sofort nach Bekanntwerden des Verdachtes auf den weiteren Einsatz von Thyreostatika verzichten wird. Unter diesen Umständen werden die T_4-Werte aber nicht tief bleiben, sondern innert 5-7 Tagen bis über den normalen Wert von rund 150 nmol/l aufsteigen. Durch zweimalige Blutentnahme bei den in Frage kommenden Tieren des betreffenden Mästers innert 7 Tagen müsste sich ein solcher Verlauf bestätigen lassen (vergl. auch Abb. 8). Falls ein solcher Verlauf beobachtet wird, deutet dieser auf einen vorgängig stattgefundenen Thyreostatikamissbrauch hin. Bleiben die T_4-Werte tief, könnte dies auf einen weitergehen-

den Thyreostatikamissbrauch hinweisen. In diesem Fall ist nun die Möglichkeit gegeben, Pansensaft, Serum und schliesslich Muskulatur und Schilddrüse zu entnehmen und bezüglich der Ursache der tiefen T_4-Werte abzuklären. Diese Möglichkeit erscheint deshalb wichtig, weil ein Mäster im Prinzip auch natürliche, stark thyreostatisch wirkende Futterkomponenten - die heute nicht bekannt sind - verwenden könnte.

Abschliessend ist zu bemerken, dass die Durchführung der oben skizzierten Schwerpunktsuntersuchungen auch dann sinnvoll erscheint, wenn nicht alle rechtlichen Aspekte der T_4-Messung und ihrer Konsequenzen geklärt sind. Allein die Tatsache, dass die Behörden auf dem Gebiet der Thyreostatika-Ueberwachung aktiv werden, dürfte auf Mäster einen abschreckenden Einfluss haben.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Stark erniedrigte Werte des Schilddrüsenhormons Thyroxin (T_4) bei Mastrindern deuten auf eine missbräuchliche Anwendung von Thyreostatika zur Steigerung der Mastleistung hin. In der vorliegenden Arbeit wurden mittels eines rasch durchführbaren ELISA-Verfahrens (Enzymuntest^R T_3/T_4, Boehringer Mannheim) folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Zunächst wurden methodische Aspekte abgeklärt: Die Uebereinstimmung des Enzymuntests T_3 und T_4 mit zwei RIA-Verfahren ergab Korrelationskoeffizienten von $r = 0.94$ (T_4) und $r = 0.89$ (T_3). Die Art der Blutentnahme war von Bedeutung: Beim Ausbluten entnommene Proben wiesen signifikant niedrigere T_4- und T_3-Werte auf als solche, die intra vitam entnommen wurden. Hämolytische Proben und solche, die längere Zeit gefroren waren, konnten nicht mehr zuverlässig bestimmt werden.

2. Bei 164 Mastrindern wurden unmittelbar vor der Schlachtung Referenzbereiche für T_4 und T_3 bestimmt. Die Resultate zeigten, dass nur geringe Rassen- bzw. Geschlechtsunterschiede feststellbar waren, dass Jahreszeit und Standort T_4- und T_3-Werte wenig beeinflussten und dass keine derart tiefen T_4- und T_3-Werte gefunden wurden, dass ein Thyreostatikamissbrauch vermutet werden musste. Der tiefste beobachtete T_4-Wert betrug 87 nmol/l, der tiefste T_3-Wert 2.1 nmol/l.

3. Fünf Mastrindern wurde während 4 Wochen täglich das Thyreostatikum Methylthiourazil (MTU) verabreicht. Rund 3 Wochen nach Beginn der MTU-Verabreichung lagen die T_4-Werte ausnahmslos unter 50 nmol/l, also wesentlich tiefer als die tiefsten in einer normalen Rinderpopulation gemessenen T_4-Werte. Dagegen sanken die T_3-Werte nur bei 2 der 5 Tiere unter die entsprechenden Werte der Rinderpopulation.

4. Zwischen dem Gewicht der Schilddrüsen und den T_3- und T_4-Werten bestand - bei nicht mit Thyreostatika behandelten Tieren - keine Korrelation.

Aus diesen Beobachtungen kann gefolgert werden, dass sich die Bestimmung von T_4 (nicht aber die Messung von T_3) als Screening-Methode zur Erkennung von Rindern, denen Thyreostatika verabreicht wurden, eignet.

Aufgrund dieser Resultate wird ein Vorgehen empfohlen, mit welchem in Schwerpunktsuntersuchungen an Schlachthöfen missbräuchliche Anwendung von Thyreostatika erfasst werden kann.

7. VERDANKUNGEN

Meinen herzlichen Dank möchte ich all jenen aussprechen, die am Zustandekommen dieser Arbeit mitgeholfen haben.

Besonderer Dank gebührt:

- Herrn Prof. Dr. P.F. Suter für die Ueberlassung des Themas.
- Herrn PD Dr. H. Lutz für seine Unterstützung.
- Fräulein E. Liedl und Herrn J. Blum, Chemiker HTL, Veterinär-Medizinisches Labor, für die sorgfältige Durchführung der T_3-, T_4- und MTU-Analysen.
- Herrn Prof. Dr. J. Blum, Abteilung für Ernährungspathologie, Institut für Tierzucht der Universität Bern und Herrn Dr. P. Kunz sowie Frau M. Weilenmann-Bossart für die hilfreichen Diskussionen. Herrn Prof. Blum zudem für die zur Verfügung gestellten Rinderseren und die Uebernahme des Korreferates.
- Herrn Dr. G. Müller, Direktor der Landwirtschaftlichen Schule Strickhof, Lindau, sowie seinen Mitarbeitern, für die Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen MTU-Verfütterung.
- Den Tierärzten und Mitarbeitern des Schlachthofes Zürich für die Ermöglichung der Entnahme von Blutproben.
- Herrn Dr. E. Eggenberger, Veterinär-Medizinische Fakultät, für seine Beratungen betreffend der statistischen Auswertung.

- Herrn F. Ackermann für die Anfertigung der graphischen Darstellungen.
- Frau E. Chakravorty, Bibliothek der Veterinär-Medizinischen Fakultät, für die Bereitstellung der notwendigen Literatur.
- Fräulein G. Schmid für die sorgfältige Erstellung des Manuskriptes.
- Herrn E. Höhn und seinen Wärterkollegen für die Hilfsbereitschaft bei den Blutprobenentnahmen am Schlachthof Zürich und an der Landwirtschaftlichen Schule Strickhof, Lindau.

Diese Arbeit wurde vom Bundesamt für Veterinärwesen finanziell unterstützt.

8. TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Tabelle 1

Reproduzierbarkeit des Enzymun Test T_3 und T_4*)

	$\bar{x}$ (nmol/l)	s (nmol/l)	V_k %
a) T_3			
Rind 1	2.6	0.073	2.82 %
Rind 2	3.25	0.096	2.96 %
b) T_4			
Rind 1	115	8.37	7.28 %
Rind 2	111	5.48	4.94 %

*) Von 2 zufällig ausgewählten Rindern wurden in Serumproben T_3 und T_4 je 10 Mal bestimmt.

Tabelle 2

Streuung der mittels ELISA bestimmten T_3- und T_4-Werte innerhalb zweier Kollektive*)

	$\bar{x}$ (nmol/l)	s (nmol/l)	V_k %
a) T_3			
Gruppe 1 (Rinder)	3.89 nmol/l	0.68 nmol/l	17.41 %
Gruppe 2 (Munis)	3.81 nmol/l	0.69 nmol/l	18.1 %
b) T_4			
Gruppe 1 (Rinder)	149.7 nmol/l	16.1 nmol/l	10.76 %
Gruppe 2 (Munis)	162.9 nmol/l	21.2 nmol/l	13.0 %

*) Je 8 Tiere pro Gruppe

Tabelle 3

Einfluss des Einfrierens der Proben auf T_3- und T_4-Werte

20 Serumproben wurden vor und nach 8 Monate dauerndem Einfrieren bei - 20°C gemessen:

	Vor		Nach	
	$\bar{x}$ (nmol/l)	s (nmol/l)	$\bar{x}$ (nmol/l)	s (nmol/l)
T_3	5.04	2.33	5.09	2.06[1])
T_4	132.3	44.69	164.55	59.6[2])

1) Unterschied nicht signifikant, $t^{3)} = -0.15$, $P > 0.05$
2) Unterschied signifikant, $t = -4.50$, $p < 0.001$
3) t-Test, gepaarte Proben (Ref. 38)

Tabelle 4

T_3- und T_4-Werte in 8 Proben, die intra vitam und beim Ausbluten entnommen wurden

	Probenentnahme			
	intra vitam		beim Ausbluten	
	$\bar{x}$ (nmol/l)	s (nmol/l)	$\bar{x}$ (nmol/l)	s (nmol/l)
T_3	5.73	1.76	4.89	1.71[1)]
T_4	142.18	40.13	121.1	36.36[2)]

1) Unterschied nicht signifikant, $t^{3)} = 2.29$, $P > 0.05$
2) Unterschied signifikant, $t = 2.30$, $P \leq 0.05$
3) t-Test, gepaarte Proben (Ref. 38)

Tabelle 5

Gewichtszunahmen im Verlauf der MTU-Verfütterung, Zusammenstellung der Messdaten

Tage der Wägung	Versuchsgruppe		Kontrollgruppe	
	$\bar{x}$ (kg)	s (kg)	$\bar{x}$ (kg)	s (kg)
1	406.6	17.21	412.4	23.76
7	416.0	17.15	425.4	24.07
14	428.0	17.67	436.8	23.42
21	442.8	18.33	nd	nd
28	457.8	14.87	452.0	25.21
33	452.6	18.57	nd	nd

nd: nicht durchgeführt

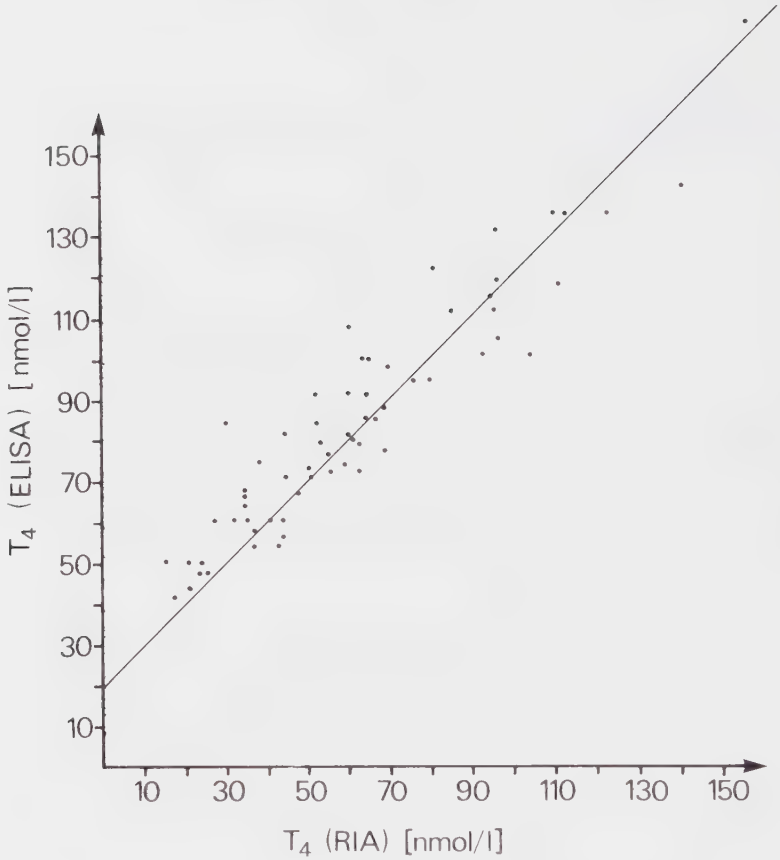


Abb. 1

Vergleich der Resultate des T_4 ELISA mit jenen des RIA

Von 63 unter verschiedenen Bedingungen gehaltenen Rindern wurden Serumproben mittels RIA (2) und später mittels Enzymun-T_4 bezüglich T_4 analysiert. Der Korrelationskoeffizient r = 0.94 deutet auf eine gute Uebereinstimmung hin. Wahrscheinlich infolge des länger dauernden Einfrierens ergab das ELISA-Verfahren systematisch höhere Werte als der RIA. Die Regressionsgerade ist charakterisiert durch: a = -19.58, b = 1.02.

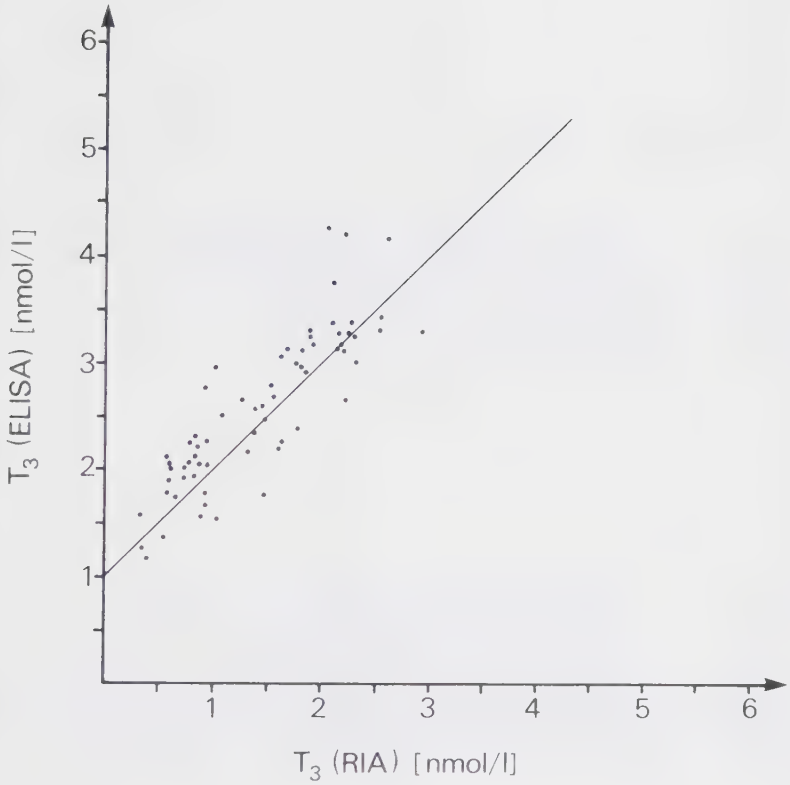


Abb. 2

Vergleich der Resultate des T_3 ELISA mit jenen des RIA

Von 61 unter verschiedenen Bedingungen gehaltenen Rindern wurden Serumproben mittels RIA (2) und später mittels Enzymun-T_3 bezüglich T_3 analysiert. Die Uebereinstimmung ist mit r = 0.89 weniger gut als bei T_4. Auch hier wurden mittels ELISA systematisch höhere Werte gefunden als mittels RIA. Allerdings ist die Abweichung weniger deutlich als beim T_4 (s. Abb. 1). Die Regressionsgerade ist charakterisiert durch: a = -0.76, b = 0.84.

Abb. 3

Bestimmung von T_4 bei Mastrindern unmittelbar vor der Schlachtung bei kalter, mittlerer und heisser Aussentemperatur

Legende:

Sim/RH = Simmenthaler / Red Holstein, männl.

SBV = Schweiz. Braunvieh

SF = Schwarzfleckvieh, männl.

Abb. 4

Bestimmung von T_3 bei Mastrindern unmittelbar vor der Schlachtung bei kalter, mittlerer und heisser Aussentemperatur

Legende: siehe Abb. 3

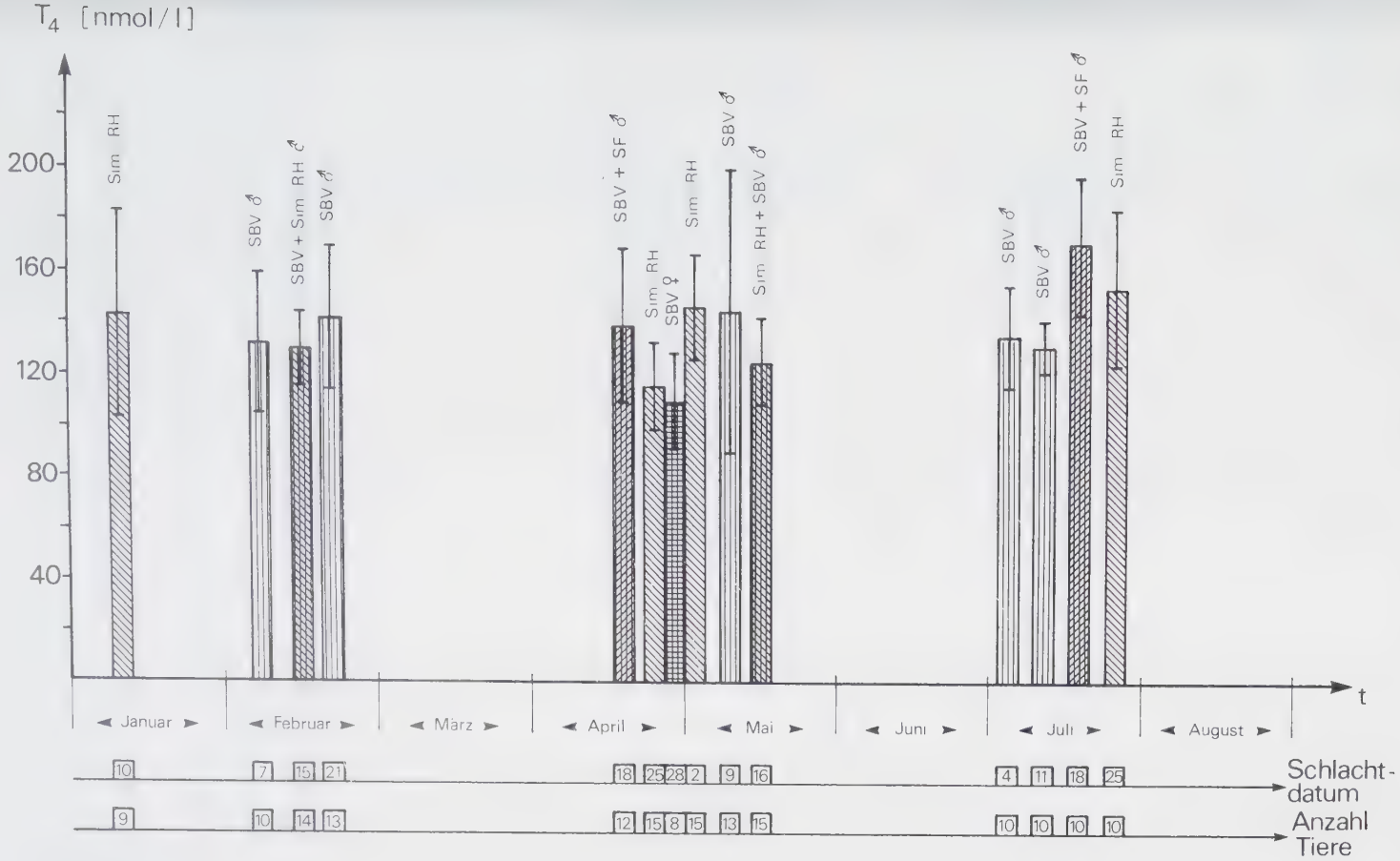

T4 [nmol/l]
200
160
120
80
40
Sim RH
SBV ♂
SBV + Sim RH ♂
SBV ♂
SBV + SF ♂
Sim RH
SBV ♀
Sim RH
SBV ♂
Sim RH + SBV ♂
SBV ♂
SBV ♂
SBV + SF ♂
Sim RH
t
Januar
Februar
März
April
Mai
Juni
Juli
August
10
7
15
21
18
25
28
2
9
16
4
11
18
25
Schlacht-datum
9
10
14
13
12
15
8
15
13
15
10
10
10
10
Anzahl Tiere

Abb. 3:

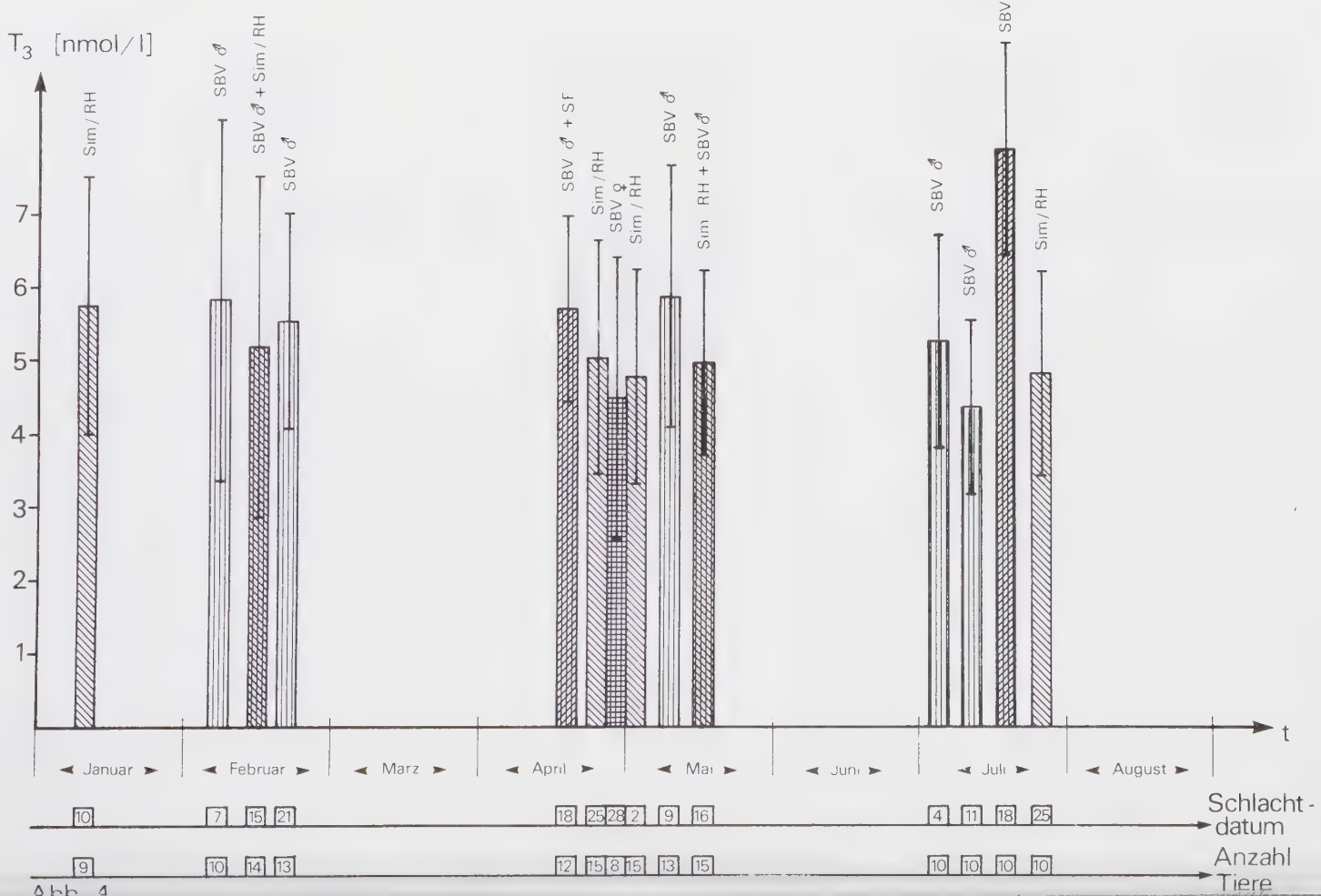

T3 [nmol/l]
Sim/RH
SBV ♂
SBV ♂ + Sim/RH
SBV ♂
SBV ♂ + SF
Sim/RH
SBV ♀
Sim/RH
SBV ♂
Sim RH + SBV ♂
SBV ♂
SBV ♂
SBV ♂
Sim/RH
1
2
3
4
5
6
7
t
Januar
Februar
März
April
Mai
Juni
Juli
August
10
7
15
21
18
25
28
2
9
16
4
11
18
25
Schlacht-datum
9
10
14
13
12
15
8
15
13
15
10
10
10
10
Anzahl Tiere

Abb. 4

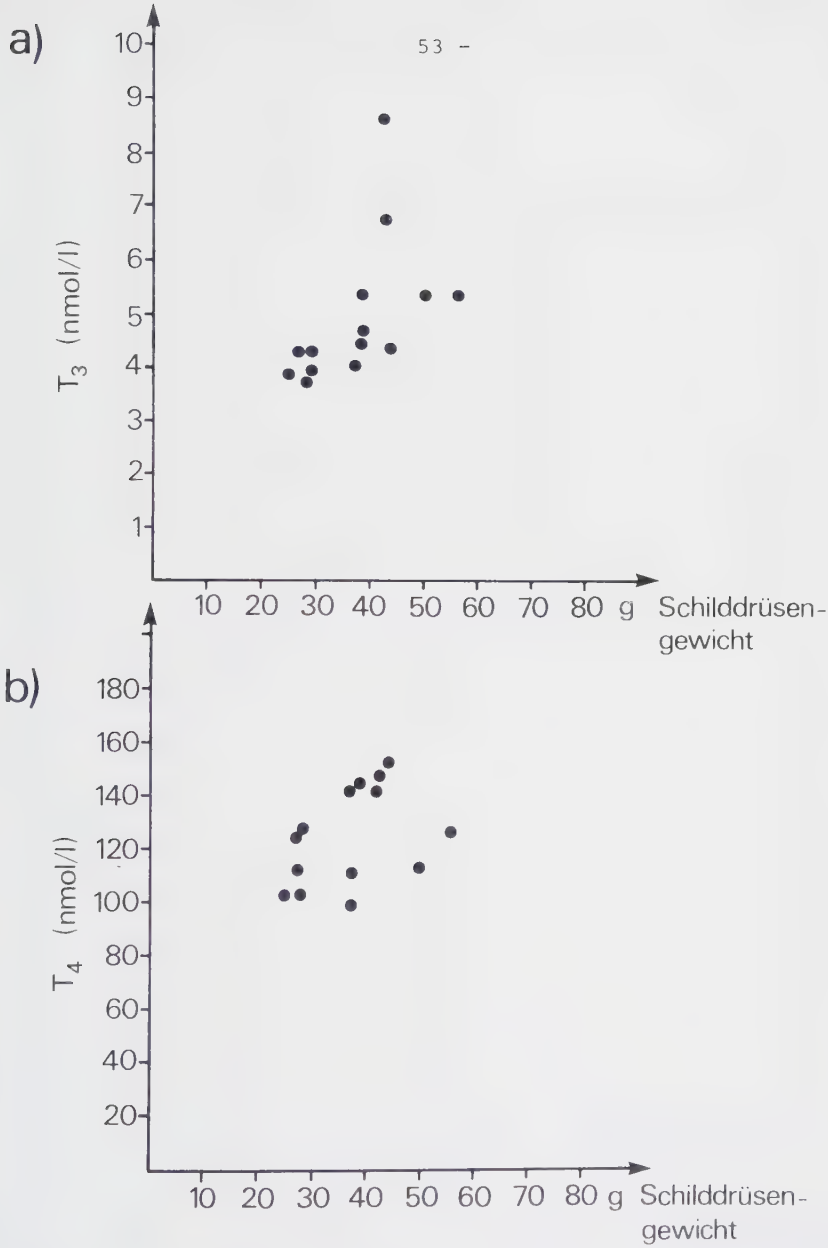


Abb. 5

Beziehung zwischen Gesamtgewicht der Thyreoidea und T_3- resp. T_4-Werten bei 14 Mastrindern

Die beiden Graphiken zeigen, dass keine enge Beziehung zwischen Drüsengewicht und T_3- resp. T_4-Werten besteht.

Abb. 6

Gewichtszunahme bei experimenteller Verfütterung von MTU

Fünf Mastochsen wurden im letzten Monat der Mast je 5 g MTU pro Tier und Tag verabreicht (ausgezogene Kurven, Tiere Nr. 6-10). Fünf weitere Tiere dienten als Kontrolle (gestrichelte Kurven, Nr. 1-5); die Kontrollen erhielten das gleiche Futter wie die Versuchstiere mit Ausnahme des MTU. Die Durchschnittswerte der Versuchstiere sind durch eine ausgezogene fette, jene der Kontrolltiere durch eine gestrichelte fette Kurve angegeben. Die gemessenen Werte sind in Tab. 5 zusammengestellt. Die Kontrolltiere wurden am Tag 28, die Versuchstiere am Tag 33 geschlachtet.

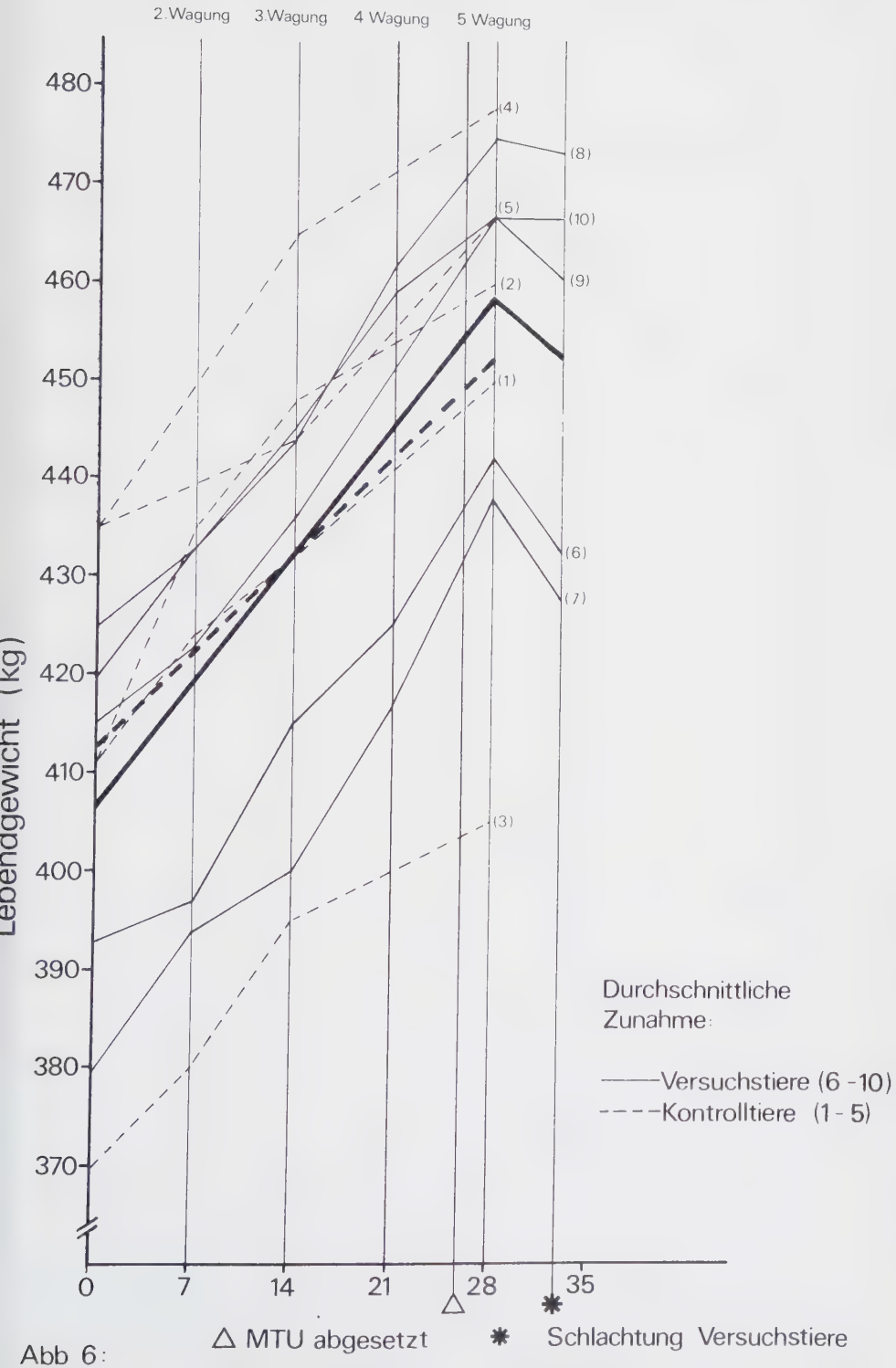
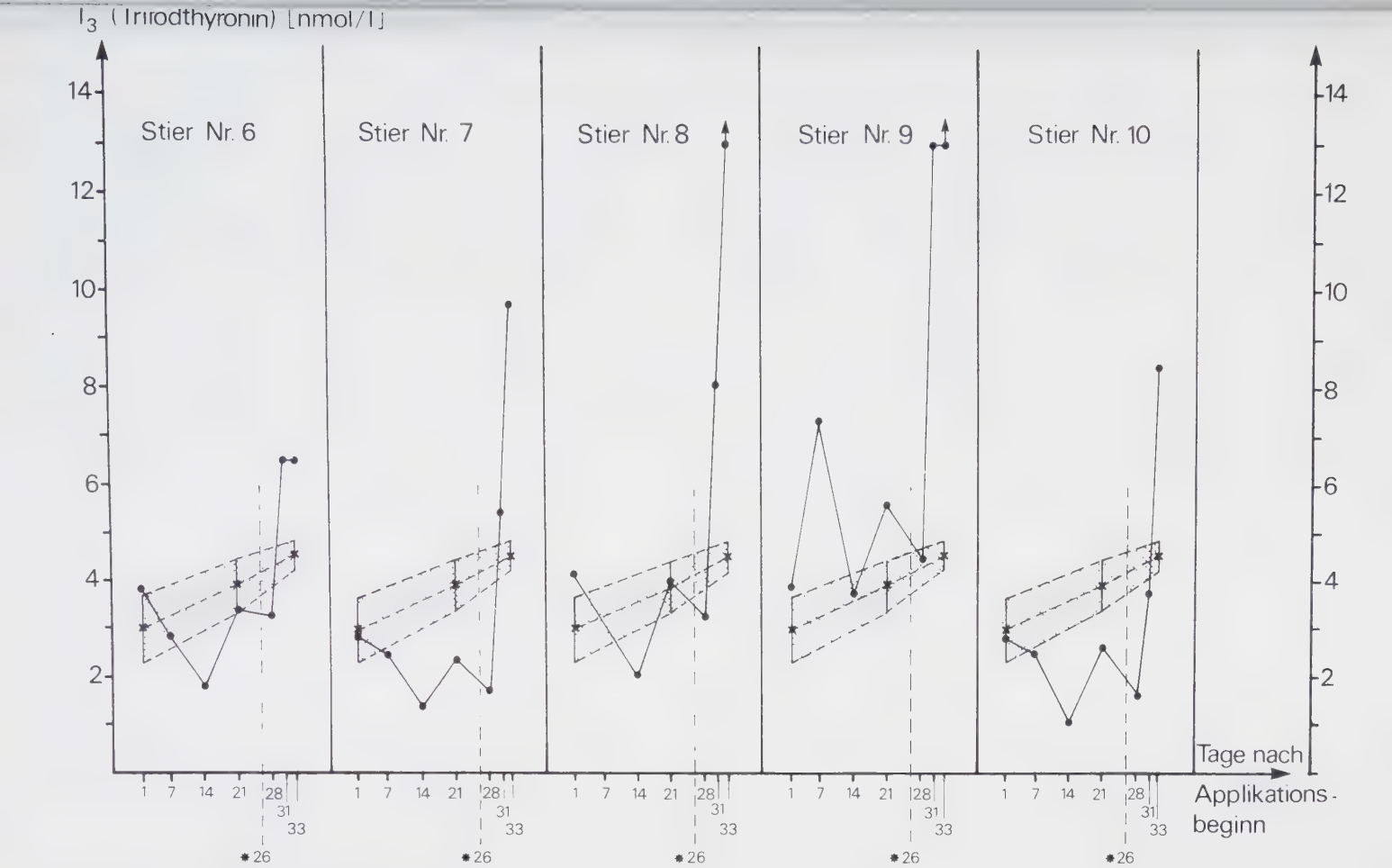

2.Wagung
3.Wagung
4 Wagung
5 Wagung
Lebendgewicht (kg)
480
470
460
450
440
430
420
410
400
390
380
370
(4)
(8)
(5)
(10)
(2)
(9)
(1)
(6)
(7)
(3)
Durchschnittliche Zunahme:
Versuchstiere (6 -10)
Kontrolltiere (1 - 5)
0
7
14
21
28
35
△ MTU abgesetzt
✱ Schlachtung Versuchstiere

Abb 6:

Abb. 7

T_3-Werte im Verlauf der MTU-Verabreichung

Die T_3-Werte der einzelnen Versuchstiere sind durch ausgezogene Kurven dargestellt. Die durch x-x geführten gestrichelten Kurven geben die Durchschnittswerte (± Standardabweichung) der Kontrolltiere an. Es wird deutlich, dass sich die T_3-Werte nach unten nur unwesentlich und nach oben nur bei 3 Tieren von den Werten der Kontrolltiere abheben.



* Am 26. Tage MTU abgesetzt

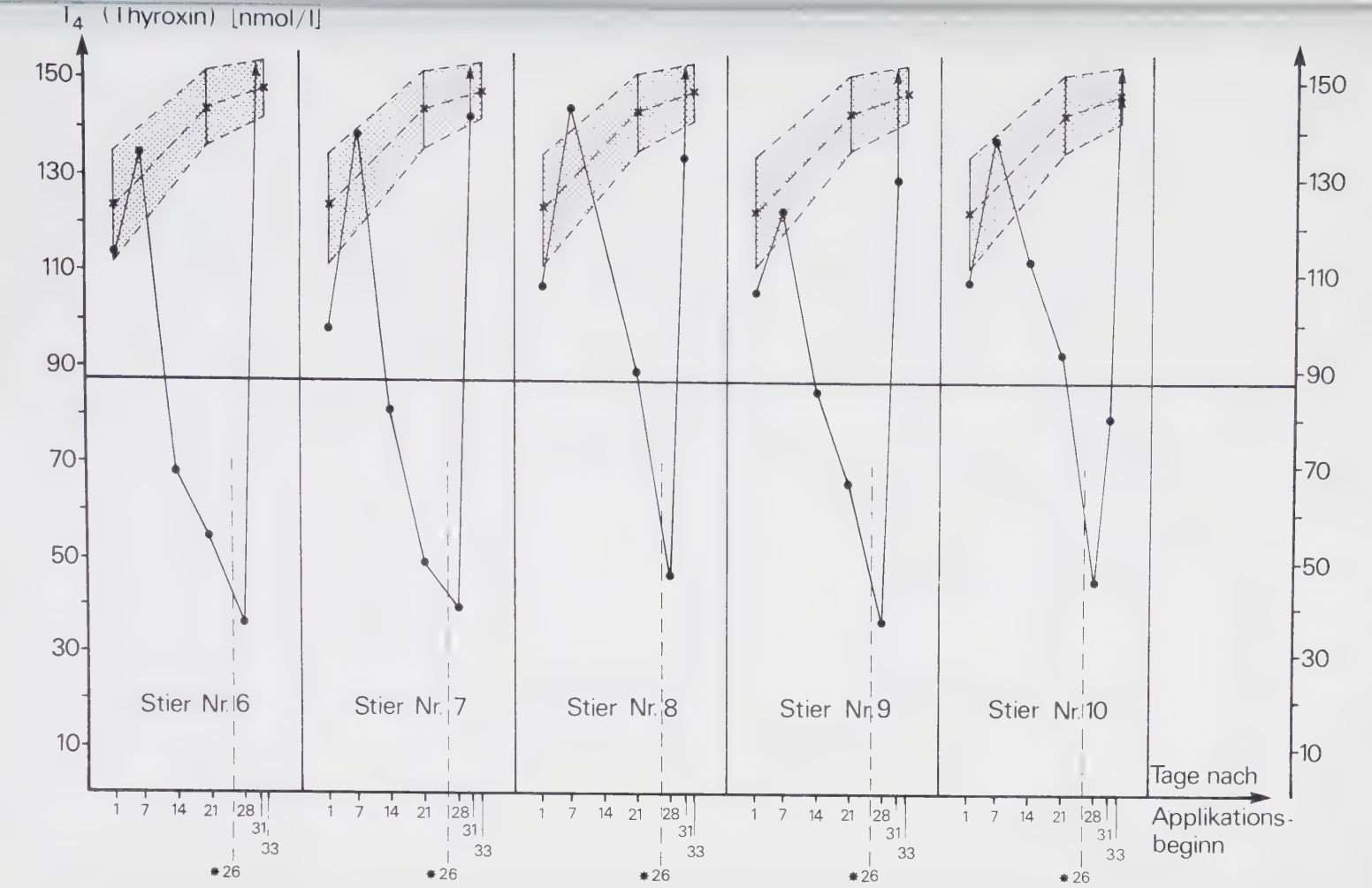
×– – – –× Kontrolltiere

Abb. 7

Abb. 8

T_4-Werte im Verlauf der MTU-Verabreichung

Die T_4-Werte der einzelnen Versuchstiere sind durch ausgezogene Kurven dargestellt. Die durch x-x geführten gestrichelten Kurven geben die Durchschnittswerte (± Standardabweichung) der Kontrolltiere an. Es wird klar, dass die T_4-Werte schon 14 Tage nach MTU-Verabreichung deutlich nach unten sinken. Zwei Tage nach Absetzen von MTU sind bei allen 5 Versuchstieren die Werte unter 50 nmol/l abgesunken. Der tiefste beobachtete T_4-Wert bei den unbehandelten Schlachtrindern (Kap. 3.2.3) betrug 87 nmol/l und ist in dieser Abbildung eingezeichnet. Damit befinden sich die T_4-Werte der 5 Versuchstiere im Zeitraum einer dem Mäster gewinnbringenden Schlachtung wesentlich unter den normalerweise zu findenden T_4-Konzentrationen.



* Am 26. Tage MTU abgesetzt

Abb. 8

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Bischoff, V. und Schneider, F. (1975): Res-O-Mat-T_4-Test, Res-O-Mat-ETR-Test und Thyroxinjod als Indikatoren der Schilddrüsenfunktion beim Rind. Schweiz. Arch. Tierheilk. 117, 533-545.

2. Blum, J.W., Kunz, P. (1981): Effects of fasting on thyroid hormone levels and kinetics of reverse triiodothyronine in cattle. Acta Endocrinol. 98, 234-239.

3. Blum, J.W., Kunz, P., Bachmann, C., Colombo, J.P. (1981): Metabolic effects of fasting in steers. Research in Veterinary Science 31, 127-129.

4. Blum, J.W. (1983): Endokrinologie und Tierproduktion. Schweiz. Arch. Tierheilk. 125, 827-850.

5. Bobek, S., Kacińska, M. und Zapletal, P. (1980): Thyroxine and triiodothyronine concentration in the serum of bull-calves and its dependance on season of birth and relationship to body weight gain. Zbl. Vet. Med. A, 27, 697-701.

6. Boguth, W. (1969): Pathophysiologie der endokrinen Drüsen. In: Pathophysiologie der Haustiere. Hersg. Spörri, H. und Stünzi, H., P. Parey Verlag, Berlin und Hamburg, 463-469.

7. Böhnel, H.-Th. (1966): Untersuchungen zum Rückstandsproblem nach Anwendung von Methylthiouracil in der Jungbullenmast. Vet.-Med. Diss., München.

8. Braun, S.L., Vogt, W., Borner, K., Delcourt, R., Eber, O., Ederveen, A.B., Haas, H., Kagedal, B., Kaltwasser, F., Lüönd, H., Oellerich, M., Haindl, H., Wagner, H. und Hengst, K. (1981): Bestimmung von Triiodthyronin im Serum mit einem heterogenen Enzymimmunoassay: Ergebnisse einer gemeinsamen Erprobung. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19, 911-918.

9. Bossart, M., Leuenberger, H., Blum, J.W. (1982): Alpungsversuche mit wachsenden Rindern unter Einfluss von Stoffwechselveränderungen. Schw. Landw. Monatsh. 60, 276-283.

10. Drepper, K. und Zucker, H. (1963): Rindermast mit Methylthiouracil (MTU). Tierzüchter 15, 389-390.

11. Fellenberg, R. von (1978): Kompendium der allgemeinen Immunologie. 1. Aufl., P. Parey Verlag, Berlin und Hamburg, 115-118.

12. Gerhartz, H. (1955): Das Verhalten der Schilddrüse unter dem Hunger. In: Stoffwechselwirkungen der Steroidhormone. Hersg. Nowakowski, H. Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

13. Godglück, G. und Siewert, E. (1971): Verfügbare Methoden zum Nachweis von Thyreostatika und Oestrogenen im Rahmen der Fleischuntersuchung. Bundesgesundheitsblatt 14, 213-217.

14. Griem, W. (1973): Pathologisch-histologische Veränderungen von Schilddrüsen bei Rindern und Kaninchen nach Verfütterung von Methylthiouracil. BMTW 86, 50-56.

15. Griem, W. (1975): Die postmortalen Veränderungen der Schilddrüse des Rindes. Fleischwirtsch. 55, 1719-1723.

16. Hale, H.B., Mefford, R.B. Jr. (1964): Nitrogen und mineral metabolism at altitude in: The physiological effect of high altitude. Weihe, W. ed., Pergamon Press Oxford.

17. Horton, G.M.J. (1981): Responses of shorn and full-fleeced lambs given two levels of feed intake and exposed to warm and cold temperatures. Am. J. Vet. Res., Vol. 42, 12, 2151-2154.

18. Matthiesen, Th. (1970): Versuche mit Methylthiouracil zur Ermittlung der unschädlichen Dosis im langfristigen Tierversuch. Vet.-Med. Diss., Hannover.

19. Nyberg, J.-A., Nilsson, P.O., Crabo, B., Ekman, L. (1968): Chemical and morphological studies of thyroid function in lactating cattle. Acta Vet. Scand. 9, 151-167.

20. Pochard, M.F. (1983): Contrôle des résidus de thyréostatiques dans la thyroïde et le muscle de bovin. Bull. Acad. Vet. de France 56, 73-82.

21a. Pohlschmidt, J. und Forschner, E. (1979): Untersuchung des Thyroxinspiegels von Mastbullen unter Methylthiouracil-Einfluss mit Hilfe eines Radioimmunassays. Fleischwirtsch. 59, 253-255.

21b. Pohlschmidt, J. und Forschner, E. (1979): Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Methylthiouracil (MTU) in Blutserum und Muskelsaft von Mastrindern. Fleischwirtsch. 59, 557-560.

22. Pottie, G. (1979): Verwendbarkeit der histologischen Schilddrüsenuntersuchung bei erwachsenen Rindern zur Ermittlung des Missbrauchs von Thyreostatika. Fleischwirtsch. 59, 248-250.

23. Rosenmund, H. und Schneider, F. (1974): Die Bestimmung des eiweissgebundenen Jods beim Rind. Zbl. Vet. Med. A 21, 142-148.

24. Scheunert, A. und Trautmann, A. (1965): Die chemische Regulierung des Stoffwechsels. In: Lehrbuch der Veterinär-Physiologie, 5. Aufl., P. Parey Verlag, Berlin und Hamburg, 50-72.

25. Schneider, F. und Rosenmund, H. (1973): Schilddrüsenfunktionsbestimmung beim Rind mit dem T_3-in-vitro-Test. Schweiz. Arch. Tierheilk. 115, 135-141.

26. Seren, E. (1973): Funzionalità tiroidea di bovini normali e trattati con metiltiouracile. Fol. Vet. Lat. 3, 52-73.

27. Siegel, E.T. (1982): Endokrine Krankheiten des Hundes. P. Parey Verlag, Berlin und Hamburg, 54-80.

28. Terplan, G., Kotter, L., Rolle, B. und Geist, H. (1964): Zur Verwendung des Thyreostatikums Methylthiouracil in der Rindermast. Fleischwirtschaft. 5, 457-462.

29. Anonym (1981): Thyreostatika zur Wassereinlagerung. Tierschutz-Broschüre, Basel.

30. Vanjonack, W.J. und Johnson, H.D. (1974): Effects of moderate heat and milk yield on plasma thyroxine in cattle. Journal of Dairy Science, Vol. 58, 4, 507-511.

31. Vos, J.G., Stephany, R.W., Caspers, J.W., van Loon, J.Th.G., Metzlar, J.W.H., Overhaus, H.B.M. (1982): Weight increase of the thyroid glands as tentative screening parameter to detect the illegal use of thyreostatics. The Veterinary Quarterly 4, 1-4.

32. Wöhlbier, W. und Friede, H.-J. (1966): Ueber die Verfütterung von Thyreostatika an landwirtschaftliche Nutztiere. Mitt. F. Tierhaltung H. 101, 14-20.

33. Wöhlbier, W. und Schneider, W. (1966): Der Stoffansatz bei Ochsen unter dem Einfluss von Methylthiouracil. Ztschr. Tierphysiologie 21, 34-40.

34. Dontenwill, W. (1966): Erzeugung von Tumoren durch endogenhormonelle Faktoren, in: O. Eichler et al. (eds.): Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Vol. XVI. 13.II, Springer Verlag, Berlin, zitiert nach Ref. 14.

35. Kaneko, J.J. (1980): Clinical biochemistry of domestic animals. Academic Press, 498-502.

36. Wildanger, W. (1975): Der sup-ppm-Nachweis thyreostatisch wirksamer Thiouracile. Z. Lebensm. Unters. 158 (1), 1-3.

37. Borner, K., Huefner, M., von zur Mühlen, A., Schleusner, H., Banauch, D., Bablock, W. (1982): Referenzbereiche für Thyroxin (T_4) und Thyroxinbindungskapazität (TBK) an drei Zentren. Lab.med. 6, 27.

38. Linder, A., Berchtold, W. (1979): Elementare statistische Methoden. UTB, 796, Verlag Birkäuser, Basel.

39. Eidgenössische Fleischschauverordnung (1957).

40. White, A., Handler, P., Smith, E., Hill., R.L., Lehman, I.R. (1978): Principles of Biochemistry. McGraw Hill.

41. Kirchgässner, M. (1970): Tierernährung. DLG Verlag, Frankfurt a.M.

42. Kracht, J., Spaethe, M. (1953): Ueber Wechselbeziehungen zwischen Schilddrüse und Nebennierenrinde. Virchows Arch. 324, 83-109.

43. Spector, E., Shideman, F.E. (1956): Metabolism of thiouracil by the rat. Fed. Proc. 15, 486.

44. Blum, J.W., Jans, F., Moses, W., Fröhli, D., Zemp, M., Wanner, M., Hart, I.C., Thun, R., Keller, U. (1985): Twentyfour-Hour Pattern of Blood Hormone and Metabolite Concentrations in High-Yielding Dairy Cows: Effects of Feeding Low or High Amounts of Starch, or Crystalline Fat. Zbl. Vet. Med. A 32, 401-418.

LEBENSLAUF

Rickenbacher Heiner, geboren am 15. Juli 1950
in Gelterkinden BL.

1957 - 1966	Primar- und Sekundarschule in Gelterkinden BL
1966 - 1967	Progymnasium in Liestal BL
1967 - 1972	Gymnasium an der Evangelischen Mittelschule in Schiers GR
1972	Eidg. Maturität (Typus C)
1972 - 1978	Studium an der Veterinär-Medizinischen Fakultät der Universität Zürich
1978	Eidg. Fachprüfung für Tierärzte
1978 - 1979	Diverse Praxisvertretungen in der Schweiz
1979 - 1981	Assistent bei Herrn Dr. med.vet. R. Wettstein in Möhlin AG
1982 - 1984	Assistent an der Veterinär-Medizinischen Klinik der Universität Zürich (Prof. Dr. P.F. Suter)
1984	Gemeinschaftspraxis mit Herrn Dr.med.vet. W. Riek in Böckten BL

Immundiagnostica
Boehringer Mannheim

Elisa-Prinzip (enzyme linked immunosorbent assay)

Enzymun-Test® T_3

Enzymimmunologischer in vitro-Test zur quantitativen Bestimmung von Gesamt-Trijodthyronin (T_3)

Best.-Nr.: **204 528** fur 100 Ansatze

Testprinzip

Der vorliegende Test beruht auf dem Kompetitionsprinzip Dabei konkurrieren im ersten Inkubationsschritt (Immunreaktion) Serum-Trijodthyronin und POD-markiertes Trijodthyronin (T_3-POD-Konjugat, Lösung 1a) um eine vorgegebene geringe Menge von spezifischen T_3-Antikörpern, die an der Innenwand der Testrohrchen fixiert sind Die Menge des sich bildenden Antikörper-T_3-POD-Komplexes stellt ein Maß für den Trijodthyronin-Gehalt der Probe dar. Im Trennschritt (bound-free-Trennung) werden das nicht gebundene T_3-POD-Konjugat und sämtliche Serum-Bestandteile entfernt. Nach Zusatz von H_2O_2 und Chromogen (ABTS®) entsteht im zweiten Inkubationsschritt (Indikatorreaktion mit Lösung 3a) ein Farbstoff, dessen Konzentration der an der Röhrchenwand gebundenen Enzymaktivität entspricht.

Die nach vorgegebener Zeit entstandene Farbintensitat wird gegen die Substrat-Pufferlösung (Lösung 3a) gemessen

Durch das Kompetitionsprinzip wird um so weniger enzymmarkiertes Trijodthyronin gebunden, je mehr Serum-Trijodthyronin in der Probe enthalten ist. Folglich nimmt die gemessene Enzymaktivitat mit steigender Serum-T_3-Konzentration ab

Die Auswertung erfolgt über eine Bezugskurve, die mit den in der Packung enthaltenen Standards erstellt wird

Richtwerte

T_3-Normalbereich 0,8–1,6 ng/ml bzw 1,23–2,46 nmol/l
Hyperthyreot $>2,0$ ng/ml bzw $>3,07$ nmol/l

Lit.: R Allner, G Traurig, W Tritschler u W Bablok, *Lab med* **6** (1982) 30

Da Normalwerte vom Einzugsbereich des Labors abhängen, also regional verschieden sein konnen, wird empfohlen, die laborspezifischen Normalwerte selbst zu ermitteln

Probenmaterial

Serum, Citrat-, Oxalat-Plasma
Haltbarkeit: bei +15–25°C vierundzwanzig Stunden
bei +4°C zwei Wochen
bei −20°C ca. vier Wochen.

Proben, die nicht am Abnahmetag untersucht werden konnen, am besten sofort einfrieren. Nur einmal auftauen! – Probenversand nur unter Kühlbedingungen (+4°C) vornehmen.

Qualitätskontrolle

Es empfiehlt sich, den Test stets nach den Richtlinien für die statistische Qualitatskontrolle durchzufuhren. Außer dem Kontrollserum der Packung können auch Precinorm® U und Precipath® U eingesetzt werden.

* ANS = 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsaure
ABTS Reagenz – nicht einnehmen Beruhrung mit der Haut oder Schleimhauten vermeiden
2 2 -Azino-di-[3 athyl-benzthiazolin-sulfonsaure (6)]-diammon umsalz

Standard und Kontrollserum sind Humanmaterial und sollten trotz des mit RIA negativen HB_sAg-Nachweises wie potentiell infektiose Patientenproben behandelt werden

Inhalt der Packung		Konzentrationen der Gebrauchslosungen
1	**Inkubationspuffer** (Kennfarbe rot; 5 x)	
	Barbiturat	120 mmol/l
	Phosphat-Puffer	18,2 mmol/l, pH 8,6
	ANS*	1,27 mmol/l (0,04 %)
	Rinderserumalbumin (RSA)	0,20 %
2	**T_3-POD-Konjugat** (Kennfarbe rot; 2x)	
	POD	ca 12 U/l
	Rinderserumalbumin (RSA)	
3	**Substrat-Puffer** (Kennfarbe grün)	
	Phosphat-Citrat-Puffer	100 mmol/l, pH 5,0
	Natriumperborat	1,47 mmol/l
4	**Substrat** (Kennfarbe grun)	
	ABTS®	9,1 mmol/l
5 a-e	**Standards** (Kennfarbe gelb)	
	T_3 in Humanserum	Konz. siehe Flaschenetikett
6	**Kontrollserum** (Kennfarbe braun)	
	T_3 in Humanserum	Sollwert s Flaschenetikett

– Tube-Box: Kunststoffrohrchen mit T_3-Antikörpern (Schaf) beschichtet. Bindungskapazität: ca. 250 pg bzw. 384 fmol Trijodthyronin pro Rohrchen
– Beutel mit Trockenmittelkapsel (zur Aufnahme ungebrauchter Rohrchen)
– Polyathylenstopfen, Öffner

482 2351 5

Boehringer Mannheim GmbH
Diagnostica

Ausgabe Februar 1982

Herstellung und Haltbarkeit der Lösungen

1 Inhalt der 5 Flaschen 1 quantitativ in die Vorratsflasche überführen und mit 105 ml dest. Wasser lösen.
(Hinweis 1) *Lichtgeschützt aufbewahren!*
Vor Gebrauch auf 20–25°C temperieren
Haltbarkeit bei +4°C drei Monate

2 Inhalt mit jeweils 0,6 ml dest. Wasser lösen und zur Herstellung der Lösung 1a verwenden
Haltbarkeit: bei +4°C vier Wochen
bei −20°C sechs Wochen
(zweimaliges Einfrieren ist möglich)

3 Inhalt der Flasche mit 105 ml dest. Wasser lösen
(Hinweis 1)
Haltbarkeit: bei +4°C drei Monate

4 Inhalt wird zur Herstellung der Gebrauchslösung 3a in Flasche 3 überführt

Gebrauchslösungen, Standards, Kontrollserum

1a **Inkubationslösung**
Tagesbedarf aus Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 100 + 1 herstellen. Für jedes Röhrchen der Mehrfachbestimmungen (Standards, Kontrollserum bzw. Proben) wird 1 ml Lsg. 1a benötigt (Hinweis 1) Schaumbildung beim Mischen vermeiden!
Lichtgeschützt aufbewahren! Nicht einfrieren!
Haltbarkeit: bei 20–25°C acht Stunden
bei +4°C vierundzwanzig Stunden

3a **Substrat-Pufferlösung**
Inhalt der Flasche 4 in Lösung 3 überführen und vollständig lösen *Lichtgeschützt aufbewahren!*
Vor Gebrauch auf 20–25°C temperieren!
Haltbarkeit: bei +4°C drei Monate

5a–5e 6 **Standards/Kontrollserum**
Inhalt mit 1 ml dest. Wasser lösen. 15 min zur Rekonstitution verschlossen stehen lassen. Ohne Schütteln sorgfältig mischen, um Homogenisierung zu erreichen (Hinweis 2).
Haltbarkeit: bei +4°C vier Wochen
bei −20°C drei Monate

Aufbewahrung und Haltbarkeit der Teströhrchen
Benötigte Anzahl von Teströhrchen erst unmittelbar vor Beginn der Durchführung aus der Tube-Box entnehmen. Nicht gebrauchte Röhrchen im Gestell belassen und zusammen mit den Trockenmittelkapseln sofort in den Polyäthylenbeutel geben und gut verschlossen lagern. Ein gelegentlich auftretender weißer Belag in den Röhrchen hat keinen Einfluß auf den Test
Haltbarkeit: bei +4°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum.

Bestimmungsansatz
Wellenlänge: Hg **405** nm, Hg 436 nm, Hg 578 nm oder
Spektralphotometer **420** nm, 620-670 nm (Hinweis 3)
Halbmikrokuvette 1 cm Schichtdicke (Hinweis 4)
Inkubationstemperatur: 20–25°C (Hinweis 5)
Messung gegen Lösung 3a (15–25°C)
Für jede Serie ist eine eigene Bezugskurve zu erstellen
Für Standards und Proben werden 2-fach-Analysen empfohlen (Hinweis 6)
Nur antikörperbeschichtete Röhrchen aus einer Packung verwenden. Andere Reagenzien aus verschiedenen Packungen der gleichen Charge können vereint werden
Pipettierungen möglichst kurz hintereinander durchführen (Hinweis 7) Lösung 1a kräftig zupipettieren oder mit dem Probenmaterial gut mischen

Gekühltes Leitungswasser (2–8°C) bereitstellen!

In Röhrchen pipettieren

	Standard a	Standard b	Standard c	Standard d	Standard e	Kontrollserum	Probe
Lösung 5a	0,1 ml			–			
Lösung 5b	–	0,1 ml		–	–		
Lösung 5c	–	–	0,1 ml	–	–		
Lösung 5d	–	–		0,1 ml		–	
Lösung 5e	–				0,1 ml		–
Lösung 6	–	–	–	–		0,1 ml	
Patienten Probe	–		–				0,1 ml
Lösung 1a	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

2 Std. bei 20–25°C inkubieren (Hinweis 8)

Röhrchen Inhalt aussaugen, verwerfen und **innerhalb von 5 min** Röhrchen einmal mit gekühltem Wasser ausspülen. Sorgfältig aussaugen (Hinweis 9) **Kein dest. Wasser verwenden.**

Lösung 3a in konstanten Zeitintervallen nacheinander in die Röhrchen pipettieren (Hinweis 10)

Lösung 3a	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

Röhrchen mit Lamellenstopfen (Hinweis 11) verschließen (Lamellenteil eindrücken, Hinweis 11). Nicht schütteln! Direktes Sonnenlicht vermeiden

ca. 60 min bei 20–25°C inkubieren (Hinweis 8)

Vor der Messung gut durchmischen, mit beigegebenem Öffner Stopfen entfernen (Hinweis 11 u. 12)

Photometer gegen Lösung 3a auf Null abgleichen

Röhrchen nach Ablauf gleichen Zeitintervallen wie beim Pipettieren in Küvette überführen und messen. Extinktionen E ablesen

Auswertung
Protokollieren
Konzentrationen der Standards und Sollwert des Kontrollserums (s. Flaschenetiketten) in Spalte Va des Protokollblattes eintragen
Einzelwerte E der gemessenen Extinktionen in Spalte III des Protokollblattes eintragen
Mittelwerte Ē berechnen und in Spalte IV eintragen.

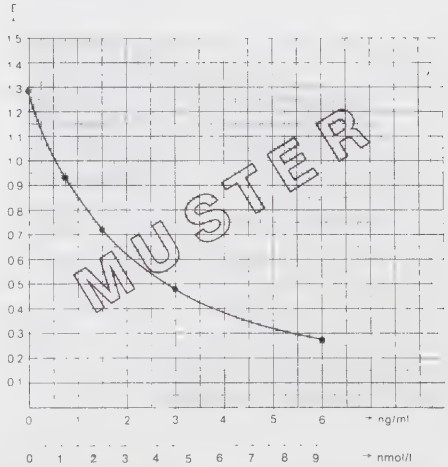
Erstellen der Bezugskurve
Auf Netzpapier zu den jeweiligen Standardkonzentrationen aus Spalte Va die zugehörigen Extinktionsmittelwerte Ē aus Spalte IV eintragen und Bezugskurve zeichnen
Abszisse (x-Achse): ng/ml bzw. nmol/l
Ordinate (y-Achse): E

Ermittlung der Probenkonzentrationen
Aus den Ē der Proben aus Spalte IV über die Bezugskurve die Trijodthyronin-Konzentrationen ablesen und in Spalte Vb des Protokollblattes eintragen

Auswertung mit Hilfe programmierbarer Kleinrechner
(Hewlett Packard HP 67/97, HP 41; Texas Instruments TI 59)
HP 67, HP 97: Immundiagnostica BMED 03 Programm P1
HP 41: Immundiagnostica BMED 06 Programm P1
TI 59: Immundiagnostica BMED 52 Programm P1
Programmkärtchen bei Boehringer Mannheim erhältlich

Umrechnungsfaktoren
nmol/l x 0,651 = ng/ml; ng/ml x 1,536 = nmol/l

Enzymun-Test® T_3
Beispiel einer Bezugskurve



Enzymun-Test® T_3

Kreuzreaktionen

Die Spezifität des in dieser Packung verwendeten T_3-Antikörpers wurde in vitro geprüft. Die Kreuzreaktionen sind aus dem Hinweiszettel der Packung ersichtlich.

Bei Patienten unter Therapie mit D-T_4-haltigen Lipidsenkern kann der Test nicht zur Bestimmung des Gesamt L-T_3 eingesetzt werden.

D-Thyroxin greift in den endogenen Schilddrüsenregelkreis ein. Soll bei entsprechend behandelten Patienten die Schilddrüsenfunktion überprüft werden, so ist zu empfehlen die D-T_4-Therapie für 4–6 Wochen zu unterbrechen, um den physiologischen Zustand wiederherzustellen.

Die übrigen in der Tabelle aufgeführten Substanzen beeinflussen das Testergebnis nicht meßbar, da sie unter physiologischen, pathologischen oder üblichen therapeutischen Bedingungen nicht in störenden Konzentrationen im Serum auftreten.

Störungen

Hämolytisches und deutlich lipämisches Probenmaterial darf nicht eingesetzt werden.

Bei 37 häufig verwendeten Pharmaka konnte mit therapeutischen Dosen in vitro keine Störung der Bestimmung festgestellt werden.

Nachweisgrenze

Die exakte Erfassung von Konzentrationen an der unteren Nachweisgrenze ist wesentlich von der im Labor erzielten Präzision abhängig. Nach den bisherigen Erfahrungen liegt dieser Wert (–3s-Bereich des Nullstandards auf Extinktionsbasis) bei 0,30 ng/ml bzw. 0,46 nmol/l.

Hinweise

1 Um eventuelle Volumenverluste bei Verwendung von Dilutoren zu kompensieren, können die Auflösevolumina der Flaschen 1 und 3 auf 120 ml erhöht werden.
Bei Doppelbestimmungen werden für 5 Standards und 1 Kontrollserum 12 Tubes pro Serie benötigt. Bei manuellem Arbeiten beträgt die Pipettierreserve 2 ml, für Dilutoren gilt anderes.
Für n Patientenproben sind erforderlich:

Anzahl der Patientenproben	Anzahl Tubes (für Proben, Standards, Kontrollserum)	Inkubationslösung 1a	
		Lsg. 1 (ml)	Lsg. 2 (µl)
8	28	30	300
13	38	40	400
19	50	52	520
44	100	102	1020
n	12 + 2n	14 + 2n	140 + 20n

2 Es empfiehlt sich, bei vorgesehenem mehrmaligem Gebrauch Standards und Kontrollserum stets einzufrieren.

3 Die Extinktionen des Standards 5a können bei Hg 405 nm, 420 nm u. Hg 436 nm sehr hoch liegen ($E_{405\,nm} \geqq 1{,}400$ bei Messung gegen Lösung 3a). Verglichen mit diesen Werten liegen die Extinktionen bei Hg 578 nm um ca. 70%, bei 620–670 nm um ca. 50% niedriger.
Liegen die Extinktionen des 5a-Standards bei Wellenlänge Hg 405 nm und bei Einhaltung der angegebenen Inkubationsbedingungen unter E = 0,500, sind die Meßergebnisse nicht als zuverlässig zu betrachten. – Wenn nach Überprüfung des Photometers (Filter, Lichtquelle, Empfänger) eine geratetechnische Störung als Ursache ausgeschlossen werden kann, ist eine transport- bzw. lagerungsbedingte Schädigung der Reagenzien zu vermuten.

4 Es kann jede Küvette verwendet werden, in der sich das Testvolumen von 1 ml einwandfrei messen läßt. Besonders bewährt haben sich Absaug- bzw. Durchflußküvetten.

5 Für die Inkubation nur Röhrchengestelle verwenden, die Raumtemperatur besitzen.

6 In der Einarbeitungsphase für den Test empfehlen wir für Standards und Proben Dreifach-Analysen. Wenn von Serie zu Serie im mittleren Konzentrationsbereich ein VK ≦ 8% erreicht wird, kann auf Zweifach-Analysen übergegangen werden. Eine Reduzierung auf Einfachbestimmungen ist aus immunologischer Sicht nicht zu empfehlen und unterliegt der Verantwortung des durchführenden Laboratoriums.

7 Zwischen Pipettierung von Serum bzw. Standard und der Zugabe von Lösung 1a dürfen maximal 20 min vergehen.

8 Alle Lösungen auf Raumtemperatur (15–25°C) bringen!
Es ist darauf zu achten, daß alle Inkubationszeiten und -temperaturen innerhalb einer Serie – gerechnet ab Zugabe Lösung 1a– für alle Röhrchen gleich sind. Die Inkubationszeiten für die Serie können variiert werden: für die 1. Inkubation 90–120 min, für die 2. Inkubation 60–75 min. Lange Inkubationszeiten ergeben hohe Extinktionswerte.

9 Zum Aussaugen eignen sich selbstausgezogene bzw. vorgefertigte Glaspipetten (z. B. Capilette®). Ebenfalls geeignet sind Kunststoffspitzen, wie sie für Kolbenhubpipetten Verwendung finden. Sie werden an eine Wasserstrahl- oder Elektropumpe angeschlossen. Bis zum Röhrchenboden muß sorgfältig ausgesaugt werden. Ein Berühren der Röhrchenwand ist ohne Belang.
Zum Auswaschen der Röhrchen gekühltes Leitungswasser verwenden. Spritzflasche oder Seripettor® rechtzeitig in den Kühlschrank stellen. Unterschiede der Wasserqualität bzw. der Ionenkonzentrationen haben keinen Einfluß auf das Testergebnis.
Zum Waschen können die Röhrchen bis zum Rand mit gekühltem Leitungswasser gefüllt werden. Das Wasser darf höchstens 5 min im Röhrchen verbleiben. Der **Aussaugeschritt** ist zweimal durchzuführen, um von der Röhrchenwand nachgelaufenes Wasser vollständig zu entfernen.

10 Beim Pipettieren der Lösung 3a sind die gleichen Zeitintervalle (z. B. 10, 15 oder 30 sec) wie beim Messen einzuhalten. Damit wird für alle Röhrchen dieselbe Inkubationszeit zur Farbentwicklung gewährleistet. Ist das Photometer mit Absaugküvette und Drucker ausgestattet, kann in sehr kurzen Zeitabständen (z. B. 5–10 sec) gemessen werden, was eine entsprechend schnelle Pipettierung erlaubt.

11 Das Verschließen mit Lamellenstopfen ist als Erleichterung beim manuellen „Über-Kopf-Mischen" zu empfehlen. Bei Verwendung eines Vibrationsmischers kann darauf verzichtet werden. Das Mischen darf erst nach der Inkubation erfolgen.

12 Zwischen Mischen und Überführen in die Küvette dürfen maximal 10 min vergehen.

Immundiagnostica Boehringer Mannheim

Elisa-Prinzip (enzyme linked immunosorbent assay)

Enzymun-Test® T_4

Enzymimmunologischer in vitro-Test zur quantitativen Bestimmung von Gesamt-Thyroxin

---

Best.-Nr. **204 510** für 100 Ansätze

Testprinzip

Der vorliegende Test beruht auf dem Kompetitionsprinzip. Dabei konkurrieren im ersten Inkubationsschritt (Immunreaktion) Serum-Thyroxin und POD-markiertes Thyroxin (Thyroxin-POD-Konjugat, Lösung 1a) um eine vorgegebene geringe Menge von spezifischen Thyroxin-Antikörpern, die an der Innenwand der Teströhrchen fixiert sind. Die Menge des sich bildenden Antikörper-Thyroxin-POD-Komplexes stellt ein Maß für den Thyroxin-Gehalt der Probe dar. Im Trennschritt (bound-free-Trennung) werden das nicht gebundene Thyroxin-POD-Konjugat und sämtliche Serum-Bestandteile entfernt. Nach Zusatz von H_2O_2 und Chromogen (ABTS®) entsteht im zweiten Inkubationsschritt (Indikatorreaktion mit Lösung 3a) ein Farbstoff, dessen Konzentration der an der Röhrchenwand gebundenen Enzymaktivität entspricht.
Die nach vorgegebener Zeit entstandene Farbintensität wird gegen die Substrat-Pufferlösung (Lösung 3a) gemessen. Durch das Kompetitionsprinzip wird um so weniger enzymmarkiertes Thyroxin gebunden, je mehr Serum-Thyroxin in der Probe enthalten ist. Folglich nimmt die gemessene Enzymaktivität mit steigender Serum-Thyroxin-Konzentration ab.
Die Auswertung erfolgt über eine Bezugskurve, die mit den in der Packung enthaltenen Standards erstellt wird.

Richtwerte

(ermittelt mit Enzymun-Test T_4 an 3 regional unterschiedlichen Kollektiven)

euthyreot 5–11,5 µg/dl bzw. 64,4–148 nmol/l
hypothyreot < 5 µg/dl bzw. 64,4 nmol/l
hyperthyreot > 11,5 µg/dl bzw. 148 nmol/l

Lit.: K. Borner, M. Huefner, A. von zur Mühlen, H. Schleusener, D. Banauch und W. Babiak: *Lab. med.* 6 (1982) 27

Da Normalwerte vom Einzugsbereich des Labors abhängen, also regional verschieden sein können, wird empfohlen, die laborspezifischen Normalwerte selbst zu ermitteln.

Probenmaterial

Serum, EDTA-, Citrat-, Oxalat-Plasma
Haltbarkeit: bei –20°C, +4°C oder 15–25°C vier Wochen

Qualitätskontrolle

Es empfiehlt sich, den Test stets nach den Richtlinien für die statistische Qualitätskontrolle durchzuführen. Außer dem Kontrollserum der Packung können auch Precinorm® U und Precipath® U eingesetzt werden.

* ANS = 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure
ABTS® = Reagenz – nicht einnehmen, Berührung mit der Haut oder Schleimhäuten vermeiden
2,2'-Azino-di-(3-äthyl-benzthiazolin-sulfonsäure-(6))-diammoniumsalz

Standard und Kontrollserum sind Humanmaterial und sollten trotz des mit RIA negativen HBsAg-Nachweises wie potentiell infektiöse Patientenproben behandelt werden.

Standards und Kontrollserum enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid (Verschlucken, Berührung mit der Haut oder Schleimhäuten vermeiden!)

	Inhalt der Packung	Konzentrationen der Gebrauchslösungen
1	**Inkubationspuffer** (Kennfarbe rot, 5 x)	
	Barbiturat	120 mmol/l
	Phosphat-Puffer	18,2 mmol/l, pH 8,6
	ANS*	1,27 mmol/l (0,04 %)
	Rinderserumalbumin (RSA)	0,20 %
2	**Thyroxin-POD-Konjugat** (Kennfarbe rot, 2x)	
	POD	ca. 12 U/l
	Rinderserumalbumin (RSA)	
3	**Substrat-Puffer** (Kennfarbe grün)	
	Phosphat-Citrat-Puffer	100 mmol/l, pH 5,0
	Natriumperborat	1,47 mmol/l
4	**Substrat** (Kennfarbe grün)	
	ABTS®	9,1 mmol/l
5 a-e	**Standards** (Kennfarbe gelb)	
	Thyroxin in Humanserum	Konz. siehe Flaschenetikett
6	**Kontrollserum** (Kennfarbe braun)	
	Thyroxin in Humanserum	Sollwerte s. Flaschenetikett

– Tube-Box: Kunststoffröhrchen mit Thyroxin-Antikörpern (Kaninchen) beschichtet. Bindungskapazität: ca. 250 pg bzw. 322 fmol Thyroxin pro Röhrchen
– Beutel mit Trockenmittelkapsel (zur Aufnahme ungebrauchter Röhrchen)

---

883 4502 3 .3

Boehringer Mannheim GmbH
Diagnostica

Ausgabe Februar 1982

Herstellung und Haltbarkeit der Lösungen

1 Inhalt der 5 Flaschen 1 quantitativ in die Vorratsflasche überführen und mit 105 ml dest. Wasser lösen (Hinweis 1) *Lichtgeschützt aufbewahren!*
Vor Gebrauch auf 20–25°C temperieren
Haltbarkeit: bei +4°C drei Monate

2 Inhalt mit jeweils 0,6 ml dest. Wasser lösen und zur Herstellung der Lösung 1a verwenden
Haltbarkeit: bei +4°C drei Monate
bei −20°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum (wiederholtes Einfrieren möglich)

3 Inhalt der Flasche mit 105 ml dest. Wasser lösen (Hinweis 1)
Haltbarkeit: bei +4°C drei Monate

4 Inhalt wird zur Herstellung der Gebrauchslösung 3a in Flasche 3 überführt

Gebrauchslösungen, Standards, Kontrollserum

1a **Inkubationslösung**
Tagesbedarf aus Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 100 + 1 herstellen. Für jedes Röhrchen der Mehrfachbestimmungen (Standards, Kontrollserum bzw. Proben) wird 1 ml Lsg. 1a benötigt (Hinweis 1). Schaumbildung beim Mischen vermeiden!
Lichtgeschützt aufbewahren! Nicht einfrieren!
Haltbarkeit: bei 20–25°C acht Stunden
bei +4°C sieben Tage.

3a **Substrat-Pufferlösung**
Inhalt der Flasche 4 in Lösung 3 überführen und vollständig lösen
Lichtgeschützt aufbewahren!
Vor Gebrauch auf 20–25°C temperieren!
Haltbarkeit: bei +4°C drei Monate

5a–5e 6 **Standards/Kontrollserum**
Inhalt unverdünnt verwenden (Hinweis 2)
Haltbarkeit: bei +15–25°C drei Tage
bei +4°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum.

Aufbewahrung und Haltbarkeit der Teströhrchen
Benötigte Anzahl von Teströhrchen erst unmittelbar vor Beginn der Durchführung aus der Tube-Box entnehmen. Nicht gebrauchte Röhrchen im Gestell belassen und zusammen mit den Trockenmittelkapseln sofort in den Polyäthylenbeutel geben und gut verschlossen lagern. Ein gelegentlich auftretender weißer Belag in den Röhrchen hat keinen Einfluß auf den Test.
Haltbarkeit: bei +4°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum

Bestimmungsansatz
Wellenlänge: Hg **405** nm, Hg 436 nm, Hg 578 nm oder Spektralphotometer **420** nm, 620-670 nm (Hinweis 3)
Halbmikrokuvette: 1 cm Schichtdicke (Hinweis 4)
Inkubationstemperatur: 20–25°C (Hinweis 5)
Messung gegen Lösung 3a (15–25°C)
Für jede Serie ist eine eigene Bezugskurve zu erstellen.
Für Standards und Proben werden 2-fach-Analysen empfohlen (Hinweis 6)
Nur antikörperbeschichtete Röhrchen aus einer Packung verwenden. Andere Reagenzien aus verschiedenen Packungen der gleichen Charge können vereint werden.
Pipettierungen möglichst kurz hintereinander durchführen (Hinweis 7). Lösung 1a kräftig zupipettieren oder mit dem Probenmaterial gut mischen

Gekühltes Leitungswasser (2–8°C) bereitstellen!

In Röhrchen pipettieren

	Standard a	Standard b	Standard c	Standard d	Standard e	Kontrollserum	Probe
Lösung 5a	0,02 ml						
Lösung 5b	–	0,02 ml	–	–	–	–	–
Lösung 5c			0,02 ml				
Lösung 5d	–	–	–	0,02 ml	–	–	–
Lösung 5e	–	–	–	–	0,02 ml	–	–
Lösung 6	–	–	–	–	–	0,02 ml	–
Patienten Probe							0,02 ml
Lösung 1a	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

2 Std. bei 20–25°C inkubieren (Hinweis 8)

Röhrchen Inhalt absaugen, verwerfen und **innerhalb von 5 min** Röhrchen einmal mit gekühltem Leitungswasser ausspülen. Sorgfältig absaugen (Hinweis 9). **Kein dest. Wasser verwenden!**

Lösung 3a in konstanten Zeitintervallen nacheinander in die Röhrchen pipettieren (Hinweis 10)

Lösung 3a	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

Nicht schütteln. Direktes Sonnenlicht vermeiden.
Ca. 60 min bei 20–25°C inkubieren (Hinweis 8)

Vor der Messung gut durchmischen (Hinweis 11)

Photometer gegen Lösung 3a auf Null abgleichen

Röhrcheninhalt in gleichen Zeitintervallen wie beim Pipettieren in Küvette überführen und messen. Extinktionen E_i ablesen

Zur Vereinfachung der Durchführung und Auswertung wird Enzymun-Test -System ES 11 empfohlen.
Epson HX 20 Immundiagnostica BMED 11

Auswertung
Protokollieren
Konzentration des Kontrollserums (s. Flaschenetikett) in Spalte Va des Protokollblattes eintragen.
Einzelwerte E_i der gemessenen Extinktionen in Spalte III des Protokollblattes eintragen
Mittelwerte $\bar{E}$ berechnen und in Spalte IV eintragen

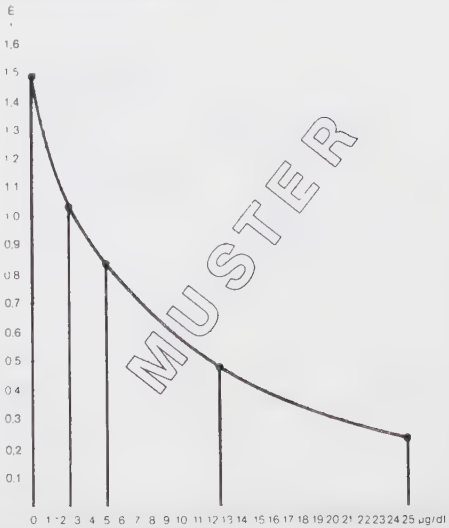
Erstellen der Bezugskurve
Auf Netzpapier zu den jeweiligen Standardkonzentrationen aus Spalte Va die zugehörigen Extinktionsmittelwerte $\bar{E}$ aus Spalte IV eintragen und Bezugskurve zeichnen
Abszisse (x-Achse): µg/dl bzw. nmol/l
Ordinate (y-Achse): $\bar{E}$

Ermittlung der Probenkonzentrationen
Aus den $\bar{E}$ der Proben aus Spalte IV über die Bezugskurve die Thyroxin-Konzentrationen ablesen und in Spalte Vb des Protokollblattes eintragen

Auswertung mit Hilfe programmierbarer Kleinrechner
(Hewlett Packard HP 67/97, HP 41, Texas Instruments TI 59)
HP 67, HP 97: Immundiagnostica BMED 03
HP 41: Immundiagnostica BMED 06
TI 59: Immundiagnostica BMED 52
Programmkärtchen bei Boehringer Mannheim

Umrechnungsfaktoren
nmol/l x 0,0777 = µg/dl, µg/dl x 12,87 = nmol/l

Enzymun-Test T_4
Beispiel einer Bezugskurve



Enzymun-Test® T_4

Kreuzreaktionen

Die Spezifität des in dieser Charge verwendeten Thyroxin (T_4)-Antikörpers wurde in vitro geprüft. Die Kreuzreaktionen (bezogen auf L-T_4 = 100 %) sind aus dem Hinweiszettel der Packung ersichtlich.

Bei Patienten unter Therapie mit D-T_4-haltigen Lipidsenkern kann der Test nicht zur Bestimmung des Gesamt L-T_4 eingesetzt werden.

D-Thyroxin greift in den endogenen Schilddrüsenregelkreis ein. Soll bei entsprechend behandelten Patienten die Schilddrüsenfunktion überprüft werden, so ist zu empfehlen die D-T_4-Therapie für 4–6 Wochen zu unterbrechen, um den physiologischen Zustand wiederherzustellen.

Die übrigen in der Tabelle aufgeführten Substanzen beeinflussen das Testergebnis nicht meßbar, da sie unter physiologischen, pathologischen oder üblichen therapeutischen Bedingungen nicht in störenden Konzentrationen im Serum auftreten.

Störungen

Hämolytisches, ikterisches oder lipämisches Probenmaterial hat keinen Einfluß auf die Richtigkeit des Testergebnisses.
Bei 43 häufig verwendeten Pharmaka (darunter Phenylbutazon und Diphenylhydantoin) konnte in vitro keine Störung der Bestimmung festgestellt werden. Zusätzlich wurden überprüft

– Schilddrüsen-Therapeutica: Methylthiouracil, Carbimazol, $KClO_4$, 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol, Thioharnstoff
– Hormone: Östron, β-Östradiol, Östriol, Diäthylstilbostrol, Testosteron

Ein signifikanter Einfluß auf das Testergebnis konnte **nicht** festgestellt werden.

Wiederfindung

Humanseren wurden mit 10 µgT_4/dl (128,7 nmol/l) bzw. 25 µgT_4/dl (321,8 nmol/l) aufgestockt. Die Wiederfindung betrug 104 % ± 6 %.

Hinweise

1 Um eventuelle Volumenverluste bei Verwendung von Dilutoren zu kompensieren, können die Auflösevolumina der Flaschen 1 und 3 auf 120 ml erhöht werden. Bei Doppelbestimmungen werden für 5 Standards und 1 Kontrollserum 12 Tubes pro Serie benötigt. Bei manuellem Arbeiten beträgt die Pipettierreserve 2 ml, für Dilutoren gilt anderes.

Anzahl der Patientenproben	Anzahl Tubes (für Proben, Standards, Kontrollserum)	Inkubationslösung 1a	
		Lsg. 1 (ml)	Lsg. 2 (µl)
8	28	30	300
13	38	40	400
19	50	52	520
44	100	102	1020
n	12 + 2n	14 + 2n	140 + 20n

2 Es empfiehlt sich, bei vorgesehenem mehrmaligem Gebrauch Standards und Kontrollserum stets einzufrieren.

3 Die Extinktionen des Standards 5a können bei Hg 405 nm, 420 nm u. Hg 436 nm sehr hoch liegen ($E_{405\,nm} \geqq 1{,}400$ bei Messung gegen Lösung 3a). Verglichen mit diesen Werten liegen die Extinktionen bei Hg 578 nm um ~70 %, bei 620–670 nm um ~50 % niedriger.
Liegen die Extinktionen des 5a-Standards bei Wellenlänge Hg 405 nm und bei Einhaltung der angegebenen Inkubationsbedingungen unter E = 0,500, sind die Meßergebnisse nicht als zuverlässig zu betrachten. – Wenn nach Überprüfung des Photometers (Filter, Lichtquelle, Empfänger) eine gerätetechnische Störung als Ursache ausgeschlossen werden kann, ist eine transport- bzw. lagerungsbedingte Schädigung der Reagenzien zu vermuten.

4 Es kann jede Küvette verwendet werden, in der sich das Testvolumen von 1 ml einwandfrei messen läßt. Besonders bewährt haben sich Absaug- bzw. Durchflußküvetten.

5 Für die Inkubation nur Röhrchengestelle verwenden, die Raumtemperatur besitzen.

6 In der Einarbeitungsphase für den Test empfehlen wir für Standards und Proben Dreifach-Analysen. Wenn von Serie zu Serie im mittleren Konzentrationsbereich ein VK ≦ 8 % erreicht wird, kann auf Zweifach-Analysen übergegangen werden. Eine Reduzierung auf Einfachbestimmungen ist aus immunologischer Sicht nicht zu empfehlen und unterliegt der Verantwortung des durchführenden Laboratoriums.

7 Zwischen Pipettierung von Serum bzw. Standard und der Zugabe von Lösung 1a dürfen maximal 20 min vergehen. Die Inkubationszeiten – gerechnet ab Zugabe Lösung 1a – müssen für alle Röhrchen einer Serie gleich lang sein.

8 Alle Lösungen auf Raumtemperatur (15–25°C) bringen! Es ist darauf zu achten, daß alle Inkubationszeiten und -temperaturen innerhalb einer Serie für alle Röhrchen gleich sind. Die Inkubationszeiten für die Serie können variiert werden: für die 1. Inkubation 90–120 min, für die 2. Inkubation 60–75 min.
Lange Inkubationszeiten ergeben hohe Extinktionswerte.

9 Zum Aussaugen eignen sich selbstausgezogene bzw. vorgefertigte Glaspipetten. Ebenfalls geeignet sind Kunststoffspitzen, wie sie für Kolbenhubpipetten Verwendung finden. Sie werden an eine Wasserstrahl- oder Elektropumpe angeschlossen. Bis zum Röhrchenboden muß sorgfältig ausgesaugt werden. Ein Berühren der Röhrchenwand ist ohne Belang.
Zum Auswaschen der Röhrchen gekühltes Leitungswasser verwenden. Spritzflasche oder Seripettor rechtzeitig in den Kühlschrank stellen. Unterschiede der Wasserqualität bzw. der Ionenkonzentrationen haben keinen Einfluß auf das Testergebnis.
Zum Waschen sollten die Röhrchen bis zum Rand mit gekühltem Leitungswasser gefüllt werden, um ungebundene Enzymaktivitäten zu entfernen. Das Wasser darf höchstens 5 min im Röhrchen verbleiben. Der **Aussaugeschritt** ist zweimal durchzuführen, um von der Röhrchenwand nachgelaufenes Wasser vollständig zu entfernen.

10 Beim Pipettieren der Lösung 3a sind die gleichen Zeitintervalle (z. B. 10, 15 oder 30 sec) wie beim Messen einzuhalten. Damit wird für alle Röhrchen dieselbe Inkubationszeit zur Farbentwicklung gewährleistet. Ist das Photometer mit Absaugküvette und Drucker ausgestattet, kann in sehr kurzen Zeitabständen (z. B. 5–10 sec) gemessen werden, was eine entsprechend schnelle Pipettierung erlaubt.

11 Zwischen Mischen und Überführen in die Küvette dürfen maximal 10 min vergehen.

Hinweis

0
0
1

Enzymun-Test® T_4, Best.-Nr.: 204 510

Für die in dieser Packung verwendeten T_4-Antikörper (Charge 03) wurden in vitro folgende Kreuzreaktionen ermittelt:

Substanz	Kreuzreaktion in %	erforderliche Konzentration (µg/dl) um 6,5 µg T_4/dl vorzutäuschen	Richtwerte im Serum bzw. therapeutische Konzentrationen (µg/dl)	Lit.
L-T_4	100	6,5	5–11,5	1
D-T_4	100	6,5	nicht bekannt	
L-T_3	0,9	1100	0,08–0,16	2
D-T_3	0,8	1250	nicht bekannt	
Tetrajodthyroessigsäure	37	19	0,075–0,29	3
3,5-Diiod-L-tyrosin	$\ll 0{,}1$	$\gg 1000$	ca. 0,8	4
3-Monoiod-L-tyrosin	$\ll 0{,}1$	$\gg 1000$	ca. 1,2	4

Lit.:
1 K. Borner, M. Huefner, A. von zur Mühlen, H. Schleusener, D. Banauch und W. Bablok, *Lab. med.* **6** (1982) 27
2 R. Allner, G. Traung, W. Tritschler u. W. Bablok, *Lab. med.* **6** (1982) 30
3 Burger, A., Vallotton, M. B. in: W. A. Haarland and J. S. Orr eds.: Thyroid Hormone Metabolism, Academic Press 1975, S. 223–239
4 Radichevich, J. et al., zitiert aus: Rhodes, B.A., Acta endocrinologica Suppl. **127** (1968) S. 26.

183.4837.3.669.385.5

mannheim boehringer
Boehringer Mannheim GmbH
Diagnostica